

**Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an
dreidimensional erhaltenen Interphasekernen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Ulf Steinhäuser
geboren am 18.09.1979
in Pößneck

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat./ med. habil Thomas Liehr
2. Prof. Dr. Stephan Diekmann
3. PD Dr. rer. nat. Andreas Henke

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.06.2007

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1.1 Entwicklung der Zellenlehre	2
1.2 Entwicklungen in der Chromosomenforschung (Zytogenetik)	2
1.3 Chromatin und Chromosomen – die DNA im Zellkern	3
1.4 Methoden der Chromosomenanalyse	4
1.4.1 Chromosomen-Bänderungstechniken	4
1.4.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	5
1.5 Stand der Forschung zur Zellkernarchitektur	9
1.5.1 Theorien der Chromosomenarchitektur	9
1.5.2 Neuere Untersuchungen zur Chromosomenarchitektur im Interphasekern	11
1.6 Zielstellung der Arbeit	12
 II. Material und Methoden	 13
2.1 Das Untersuchungsmaterial und seine Aufarbeitung	13
2.1.1 Kultivierung der verwendeten Zellen	13
2.1.1.1 Kultivierung von Lymphozyten	13
2.1.1.2 Kultivierung von Zelllinien	15
2.1.2 Herstellung von Zellkern- und Chromosomenpräparaten	15
2.1.3 Herstellung histologischer Schnitte	16
2.2 Vorbehandlung der Zellpräparate	18
2.2.1 Vorbehandlung der Kern- und Chromosomenpräparate	18
2.2.1.1 Pepsinverdau und Postfixierung	18
2.2.1.2 Denaturierung der Objektträger	19
2.2.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte	20
2.2.2.1 Entfernung des Kunstharzes	20
2.2.2.2 Pepsinverdau und Denaturierung der Gewebeschnitte	20
2.2.3 Vorbehandlung des S-FISH-Präparate	21
2.2.3.1 Waschung und Rehydrierung	21
2.2.3.2 Pepsinverdau und Denaturierung bei S-FISH	22

2.3 Die DNA-Sonden, ihre Herstellung und Vorbereitung	23
2.3.1 Kommerzielle Zentromersonden	23
2.3.2 Durch Mikrosezierung gewonnene Sonden	24
2.3.2.1 Technik der Mikrosezierung	24
2.3.2.2 Ganz-(<i>wcp</i>) und Teilchromosomen-(<i>pcp</i>)- <i>painting</i> -Sonden	25
2.3.2.3 Multicolor-Banding-Sonden (MCB)	25
2.3.3 Markierung, Vorbereitung und Hybridisierung der Mikrosezierungs-Sonden	25
2.3.3.1 Markierungs-PCR (<i>labelling</i> -PCR)	25
2.3.3.2 DNA-Fällung	28
2.4 Vorbereitung der Sonde und Hybridisierung	30
2.4.1 Posthybridisierungswaschung, Detektion und Gegenfärbung	31
2.4.2 Durchführung von Waschung und Detektion bei der Standard-FISH	32
2.4.3 Herstellung einer fixierenden Gegenfärbung für S-FISH	33
2.4.4 Durchführung von Waschung und Detektion bei S-FISH	33
2.5 Auswertung der Analysen	35
 III. Ergebnisse	 36
3.1 Von der Routine-Chromosomenpräparation abgeleitete 3D-Methode	36
3.1.1 Reduktion der Luftfeuchte über Silicagel	36
3.1.2 Präparation unter absoluten Trockenbedingungen	39
3.1.3 Verwendete Sonden	41
3.2 Schichtmethode für solide Gewebe (ML-FISH)	42
3.2.1 Durchführung der Schichtmethode	42
3.2.2 Verwendete Sonden	43
3.3 Direkte Suspensions-Hybridisierung (S-FISH)	44
3.3.1 Methode des <i>Suspension</i> -FISH-Verfahrens (S-FISH)	44
3.3.2 Verwendete Sonden	45
3.3.2.1 Verwendete Teilchromosomensonden (<i>pcp</i> -Sonden)	45
3.3.2.2 Verwendete Ganzchromosomensonden (<i>wcp</i> -Sonden)	46
3.3.2.3 Zentromersonden	47
3.3.2.4 FISH-Bänderungstechniken (MCB)	48

3.3.3 Besondere Anwendungsmöglichkeiten.....	49
3.3.3.1 Analyse von Amniozentesematerial.....	50
3.3.3.2 Analysen an menschlichen Spermien.....	51
3.3.3.3 3D-Analysen im Stadium der Metaphase.....	52
3.3.4 Erreichen nativer Kerngrößen.....	53
3.4 Software zur 3D-Rekonstruktion.....	54
 IV. Diskussion.....	 55
4.1 Von der Routinezytogenetik abgeleitete 3D-Methoden.....	55
4.1.1 Reduktion der Luftfeuchte über Silicagel.....	55
4.1.2 Präparation unter absoluten Trocknungsbedingungen.....	56
4.2 Schichtmethode für solide Gewebe (ML-FISH).....	57
4.3 Direkte Suspensions-Hybridisierung (S-FISH).....	58
4.3.1 Probleme des S-FISH.....	58
4.3.1.1 Hohe Verluste von Zellmaterial.....	58
4.3.1.2 Varianz der Hybridisierungsergebnisse zwischen den unterschiedlichen Sondenklassen.....	59
4.3.1.2.1 Konzentration des DNA-Hybridisierungsansatzes.....	59
4.3.1.2.2 Beeinflussung der Hybridisierung durch Colchizin.....	60
4.3.1.3 Kernmobilität bei der mikroskopischen Analyse.....	60
4.3.1.3.1 Fixierung mit Gelatine.....	61
4.3.1.3.2 Fixierung mittels Agarosegel.....	61
4.3.2 Möglichkeiten und Grenzen des S-FISH.....	61
4.4 Software und Analyse.....	63
4.5 Vergleiche mit anderen 3D-Protokollen.....	65
4.6 Ausblick.....	67
 V. Zusammenfassung.....	 69
VI. Literaturverzeichnis.....	71
VII. Publikationsliste.....	79
VIII. Ehrenwörtliche Erklärung	
IX. Lebenslauf	
X. Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes, steriles und pyrogenfreies Wasser
<i>BAC</i>	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bzw.	beziehungsweise
CCD-Kamera	charge couled device-Kamera (gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor)
cenM-FISH	Sondenset, bestehend aus Zentromersonden für alle Chromsomen
Cep	Zentromer
Chr.	Chromosom
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomogramm
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxy-Adenosin-triphosphat
DEAC	Diethylaminocumarin-5-dUTP
dCTP	Desoxy-Cytosin-triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOP	degenerierter Oligonukleotid-Primer
DOP-PCR	PCR bei der ein DOP-Primer verwendet wird
DS	Dextransulfat (Hybridisierungspuffer)
dTTP	Desoxy-Thymidin-triphosphat
dUTP	Desoxy-Uridin-triphosphat
<i>ECACC</i>	<i>The European Collection of Cell Cultures</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i>
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
ggf.	gegebenenfalls

GTG	G-Bänderung (mittels Giemsa und Trypsin)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HeLa	Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Patientin: Henrietta Lacks)
H ₂ O	Wasser
inkl.	inklusive
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
LSI	region- (locus-) spezifische Sonde
LSM	Laser scanning Mikroskop
MCB	multi color banding
M-FISH	Multicolor-FISH
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomogramm
NaCl	Natriumchlorid
o. g.	oben genannt
OT	Objektträger
p	den kurzen Arm des Chromosoms betreffend
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<i>pcp</i>	Teil-Chromosomen-Sonde (<i>partial chromosome painting</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVC	Polyvinylchlorid
q	den langen Arm des Chromosoms betreffend
RT	Raumtemperatur
Rx-FISH	<i>cross-species color banding</i>
s	Sekunde
SG	SpectrumGreen-dUTP (Vysis [®])
SKY	<i>spectral karyotyping</i>
SO	SpectrumOrange-dUTP (Vysis [®])
SR	SpectrumRed-dUTP (Vysis [®])
SSC	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat
SSCT	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat mit Tween
SSCTM	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat mit Tween und Marvel

subcenM-FISH	Sondenmix unter Verwendung Zentromernaher BAC Sonden und <i>pcp</i> -Sonden
Taq-Polymerase	thermostabile DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TR	TexasRed-12-dUTP (Molekular Probes®)
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
Tw	Tween
Tween	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
UV	ultraviolett
<i>wcp</i>	Ganzchromosomen-Sonde (<i>whole chromosome painting</i>)
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
z. B.	zum Beispiel

I. Einleitung

Seit der Mensch anfang, sich wissenschaftlich mit seiner eigenen Herkunft und dem Bau seiner Zellen zu beschäftigen, stellt er sich auch Fragen zum Aufbau und zur Struktur der intrazellularen Bestandteile. Mit der Entwicklung erster Mikroskope im 17. Jahrhundert war ein Grundstein für viele Entdeckungen auf dem Gebiet der Zellenlehre gelegt. Der Zellkern als solcher konnte erstmals von dem englischen Botaniker Robert Brown beschrieben werden. 1831 gab er ihm den Namen *Nucleus*. Die deutschen Forscher Arnold und Flemming entdeckten in den Jahren 1879 und 1880 die Chromosomen als wesentlichen inneren Bestandteil des Zellkerns.

Seitdem wurden verschiedene weitere Geräte und Methoden entwickelt, um die Beziehungen der Chromosomen zueinander, ihre Lage im Zellkern und letztendlich auch Veränderungen dieser, welche zu klinischen Konsequenzen führen, beobachten zu können.

Derartigen Analysen lagen bisher fast immer Metaphasechromosomen zugrunde, welche durch verschiedene Präparationsschritte zweidimensional darstellbar und mittels verschiedener Färbemethoden unterscheidbar sind. Bei den so vorbehandelten Chromosomen und Interphasezellkernen handelt es sich jedoch um, durch Quellungsvorgänge entstandene, Kunstprodukte, die von der nativen Größe und Struktur, besonders hinsichtlich ihrer Dreidimensionalität erheblich abweichen.

Zum besseren Verständnis der dreidimensionalen Architektur des Zellkerns und seiner Bestandteile sowie zur möglichen Erklärung der Entstehung chromosomaler Veränderungen sind Methoden gefragt, welche naturnahe Zustände von Zellkernen einerseits und die Darstellung von Chromosomen andererseits miteinander verbinden.

Die bisher einzige Möglichkeit, Zellkerne dreidimensional präparieren und färben zu können, wurde 2002 von Solovei und Kollegen beschrieben. Untersuchungen sind bei dieser Technik jedoch nur anhand von Fibroblasten möglich, welche einen abgeflachten Zellkern haben.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer auf verschiedene Gewebe anwendbaren Methode, welche Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf dreidimensional erhaltenen Zellkernen und Chromosomen möglich macht.

1.1 Entwicklung der Zellenlehre

Versuche, hinter die Geheimnisse des Aufbaus des Menschen und seiner kleinsten Bausteine zu gelangen, begannen schon sehr früh. Bereits 1665 entdeckte der bekannte Zellbiologe Robert Hooke zufällig, dass Flaschenkork aus winzigen Räumen aufgebaut ist. Diese nannte er damals schon „cells“. Wenige Jahre später (um 1680) konnte der niederländische Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek mit ersten selbstkonstruierten Mikroskopen einzellige Tiere und Bakterien beschreiben (Kleinig und Sitte, 1984). Durch die Entwicklung von Mikroskopen mit einer optischen Auflösung von 1 μm im Jahre 1823 (Fraunhofer-Mikroskope) wurde die Möglichkeit erschlossen, kleinere Partikel innerhalb der Zelle beschreiben zu können (Kleinig und Sitte, 1984). So konnte der deutsche Zellbiologe Matthias Jacob Schleiden seine „Untersuchungen über die Zellentwicklung“ (1838) durchführen. Dabei entdeckte er auch das Kernkörperchen, den *Nucleolus*, das heute als Zusammenlagerung der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen mit der *nucleolus organizing region* bekannt ist.

Angeregt durch die Ergebnisse Schleidens veröffentlichte 1839 Theodor Schwann sein Werk „Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen“ und wurde damit zum Begründer der Zellenlehre.

1.2 Entwicklungen in der Chromosomenforschung (Zytogenetik)

Mit der Entdeckung der Chromosomen in den Jahren 1879 und 1880 durch die deutschen Forscher Arnold und Flemming wurde ein neues Kapitel in der Erforschung von Intrazellulärsubstanzen aufgeschlagen. Der Begriff Chromosom wurde allerdings erst durch Waldeyer (1888) eingeführt. Dies stellte den Beginn der Entwicklung der Zytogenetik als eigenständig etablierte Wissenschaft dar. Der Begriff Chromosom war allerdings damals rein deskriptiv und nicht funktionell gewählt worden, denn er setzt sich aus den griechischen Worten *chromos* für Farbe und *soma* für Körper zusammen. Somit war das Chromosom zunächst als gefärbter bzw. anfärbbarer Körper beschrieben worden. Zu dieser Zeit war noch nicht erkennbar, dass diese gefärbten Körper die Träger der Erbinformation sind. Dies wurde durch Sutton im Jahre 1904 in seiner „Chromosomentheorie der Vererbung“ (The chromosomes inheritance) postuliert. Allerdings war eine ähnliche Theorie schon 1896 durch Edmund B. Wilson in seinem Werk „*The Cell in Development and Inheritance*“ vorweggenommen worden, die eine

zukunftsweisende Zusammenfassung der damaligen Zellbiologie darstellte. Trotzdem gelten heute Sutton und Boveri (Boveri, 1909) als Begründer der klassischen Zytogenetik. Trotz dieser Erkenntnisse war es bis Mitte des 20. Jahrhunderts nicht möglich, Chromosomen qualitativ hochwertig und reproduzierbar darzustellen. Da dies auch zur Folge hatte, dass Chromosomen schlecht zu zählen waren, ging man während dieser Zeit von einem Chromosomensatz von 48 aus. Durch die Veränderung der Präparation unter Zuhilfenahme einer hypotonen KCl-Lösung (Hsu, 1952) wurde es möglich, gespreitete Metaphaseplatten reproduzierbar darzustellen. Dabei wurde entdeckt, dass der Mensch nicht 48 sondern 46 Chromosomen pro diploidem Chromosomensatz aufweist (Tijo und Levan, 1956).

Erste Chromosomenveränderungen wurden beim Ullrich-Turner-Syndrom (Ford et al., 1959), bei dem ein Geschlechtschromosom fehlt, und bei der Trisomie 21, dem Down-Syndrom (Lejeune, 1959), erstmals beschrieben. Diese Entdeckungen markierten den Beginn der Zytogenetik.

1.3 Chromatin und Chromosomen – die DNA im Zellkern

Chromosomen als die Verpackungseinheit der menschlichen Erbinformationen weisen einen charakteristischen Bau auf. Dabei ist zu erkennen, dass jedes Chromosom nur zu einem Drittel aus dem eigentlichen genetischen Material, dem DNA-Doppelstrang, besteht. Die verbleibenden zwei Drittel sind saure und basische Proteine, wovon sich wiederum ein Drittel aus Histon- und zwei Drittel aus Nicht-Histon-Proteinen rekrutieren. Eine Gruppe von jeweils acht Histonen (Histon-Oktamer) bilden eine Struktur, die als Nukleosom bezeichnet wird. Um ein solches Nukleosom winden sich in 1,7 Windungen exakt 146 Basenpaare. Alle drei Bestandteile zusammen, also der DNA-Doppelstrang, die Histone und die Nicht-Histon-Proteine nennt man Chromatin (Knippers, 2001). Heute ist bekannt, dass der Chromatinfaden in feinen Schlaufen, so genannten *loops*, gefaltet ist und seinerseits innerhalb des Chromosoms in spezifischer Weise um ein Stützgerüst, als *scaffold* bezeichneten Komplex, aus Nicht-Histon-Proteinen angeordnet ist (Saitoh und Laemmli, 1994). Der Chromatinfaden bildet mit Hilfe der *loops* und *scaffolds* die Chromatide, welche aus einem kurzen und einem langen Arm eines Chromosoms, verbunden durch das Zentromer, besteht. Sie beinhaltet also den halben DNA-Gehalt eines Zwei-Chromatid-Chromosoms (siehe Abb. 1.1. und 1.2.).

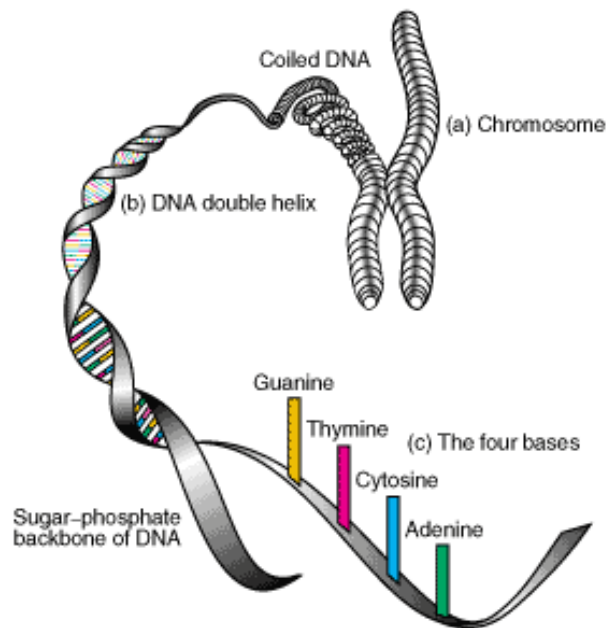


Abb. 1.1. Strukturmodell von DNA und Chromosomen (Science and Technology, www.llnl.gov/str/June03/gifs)

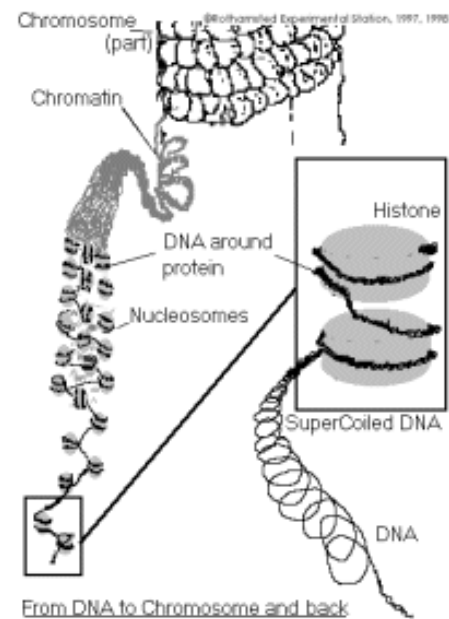


Abb. 1.2 Intrachromosomale DNA-Packung (Molecular Biology Notebook, www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/notebook)

1.4 Methoden der Chromosomenanalyse

1.4.1 Chromosomen-Bänderungstechniken

Mit der Einführung spezifischer Bänderungsverfahren (Caspersson *et al.*, 1968, 1970, 1971) konnte erstmals eindeutig und reproduzierbar einzelne Chromosomen voneinander unterschieden werden, da die Abfolge der einzelnen Banden chromosomenspezifisch ist. Dies ließ erste Einblicke in die Chromosomenstruktur zu und ermöglichte es, intrachromosomale Umbauten zu erkennen, wenn diese eine veränderte Abfolge der Bandenmuster zur Folge hatten. Mit dieser Entwicklung war der Grundstein der Humanzytogenetik als klinisch bedeutsame Wissenschaft gelegt, da bis zu diesem Zeitpunkt nur relativ grobe Chromosomenveränderungen mit Unterschieden in ihrer Anzahl, der Größe, dem Zentromerindex und dem Verhältnis des kurzen zum langen Arm unterschieden werden konnten.

Das wichtigste, da am häufigsten angewandte Verfahren, ist die GTG-Färbung (Seabright, 1971) welches man auch als „G-Banding“ bezeichnet. Sie kommt auch heute noch in der Routinezytogenetik zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um eine Färbung, welche auf einem Verdau mit Trypsin und anschließender Färbung mit Giemsa-Färbestoff beruht und zu einer spezifischen Abfolge heller und dunkler Banden führt.

Weitere, in der Routine-Zytogenetik eingesetzte Bänderungstechniken sind das „R-Banding“ (Dutrillaux, 1971), eine zum „G-Banding“ reverse Färbemethode, das so

genannte „Q-Banding“ (Caspersson *et al.*, 1968, 1970, 1971), bei dem AT-reiche chromosomale Regionen mit Quinacrin angefärbt werden und das „C-Banding“ (Arrighi und Hsu, 1971, Sumner 1972), eine Färbung des konstitutiven Heterochromatins. Mit der NOR-Färbung werden die Satellitenstiele der akrozentrischen Chromosomen gefärbt (Howell *et al.*, 1975, Bloom und Goodpasture 1976) und damit die *nucleolus organizing region* (NOR) dargestellt.

Die Anwendung der genannten Färbemethoden ist jedoch im Interphasekern nicht möglich, da einerseits die notwendigen Quellungsvorgänge und die, für die Bindung der Farbstoffe notwendige Schritte, z.B. die Trypsinierung beim „G-Banding“, nicht selektiv auf die Chromosomen sondern auf die Gesamtstruktur des Zellkerns einwirken und ihn in seiner nativen Integrität zerstören würden. Andererseits ist der Grad der Kondensation der Chromosomen in der Metaphase höher als in der Interphase. Somit würde die Bänderung sehr diffus erscheinen und wäre für eine klare Charakterisierung unbrauchbar.

1.4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Anwendung einer *in situ* Hybridisierung zur Darstellung menschlicher chromosomaler Regionen mittels fluoreszierender Farbstoffe und deren optische Detektion wurde erstmals im Jahr 1986 (Pinkel *et al.*, 1986) publiziert. Schon seit 1981 (Langer *et al.*, 1981) waren damit Versuche an nicht-menschlichen Chromosomen durchgeführt worden. Erste *in situ* Hybridisierungen – jedoch als radioaktive *in situ* Hybridisierung (RISH), wurden erstmals 1969 von Pardue und Gall sowie von John und Kollegen beschrieben. Mit diesen Entwicklungen begann sich eine neue Wissenschaft zu entwickeln, welche die bisherige Chromosomenforschung revolutionieren sollte – die molekulare Zytogenetik.

Das Prinzip der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Bei dieser Methode werden DNA-Abschnitte mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Man unterscheidet die direkte Markierung und die indirekte Markierung der Sonden-DNA. Bei der direkten Markierung werden Fluoreszenzfarbstoffe, bei der indirekten Markierung Haptene wie Biotin oder Digoxigenin in die DNA eingebaut. An diese Haptene kann dann mittels Antikörper ein Fluorochrom gekoppelt werden.

Der Einbau der Haptene in die DNA geschieht mittels Polymerasekettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) oder Nick Translation (Rigby *et al.*, 1977). Im Anschluss daran wird die nun gewonnene DNA-Sonde denaturiert und liegt dann einzelsträngig vor, was die

Voraussetzung für die Bindung an die Ziel-DNA darstellt. Zur Hybridisierung wird die DNA-Sonde auf den Objektträger (OT) mit der Ziel-DNA gegeben, wo sie an die entsprechenden homologen Sequenzen binden kann. Die indirekt markierte DNA muss abschließend noch mit fluorchromgekoppelten Antikörpern detektiert werden. Schließlich kann das Untersuchungsmaterial unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

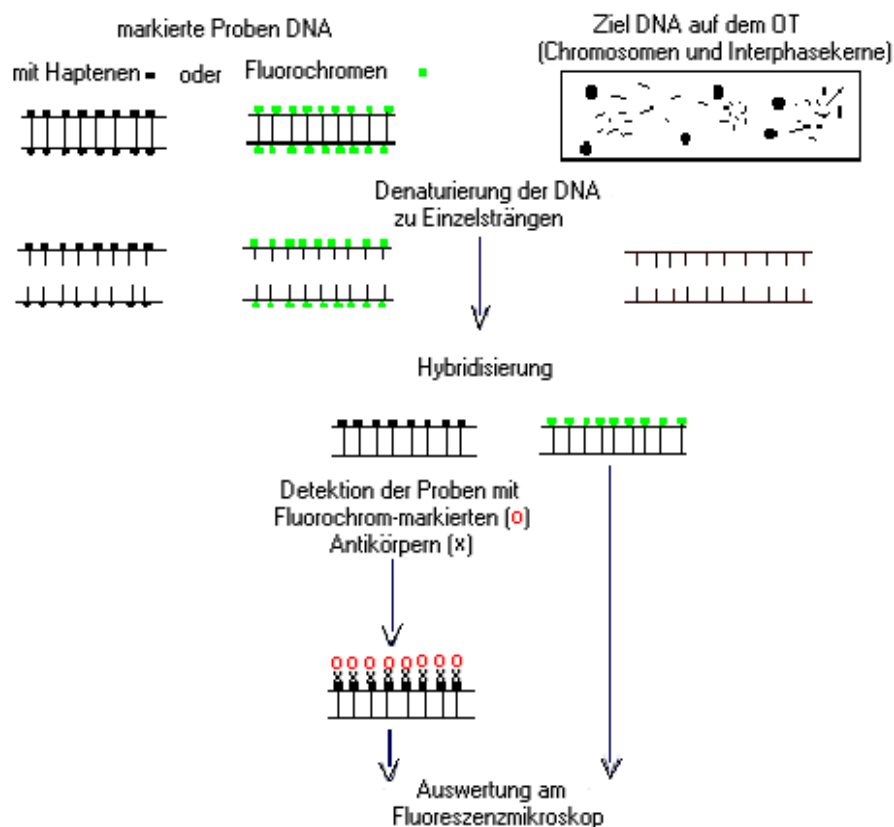


Abb. 1.3 Prinzip der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Starke, H., 2004)

FISH-Färbemethoden

Nachdem Langer seit 1981 und Pinkel et al. 1986 ihre ersten FISH-Experimente an nicht-menschlichen und menschlichen Chromosomen beschrieben hatten, begann sich die molekulare Zytogenetik schnell weiter zu entwickeln. So konnte bereits 1986 das erste Zwei-Farb-FISH-Experiment (Hopman *et al.*, 1986) publiziert werden. Mit der Entwicklung verschiedener bzw. verbesserter Detektionssysteme war es möglich, das Untersuchungsergebnis in kürzerer Zeit zu erhalten.

Mit dem Aufkommen unterschiedlicher Fluorochrome in Verbindung mit der Entwicklung von DNA-Sonden für immer neue chromosomale Regionen konnte die Variabilität der Methode weiter verbessert werden.

1989 veröffentlichte Nederlof (Nederlof *et al.*, 1989) das erste Viel-Farben-FISH-Experiment.

Durch diese Entwicklungen eröffnete sich die Möglichkeit, die FISH als vielfältige Methode in der weiterführenden Diagnostik von chromosomalen Veränderungen anzuwenden (Übersicht bei Liehr *et al.*, 2004).

Abgeleitet aus der Entwicklung von Nederlof gelang 1996 erstmalig die Darstellung jedes einzelnen Chromosoms des menschlichen Karyotyps mit 24 verschiedenen Farben (Schröck *et al.*, 1996; Speicher *et al.*, 1996). Hierfür war nur ein einziger Hybridisierungsschritt nötig. Diese Entwicklung wurde als *spectral karyotyping* (SKY) bzw. *multiplex-FISH* (M-FISH) bezeichnet. Es handelt sich bei dieser Technik um die Anwendung von Ganzchromosomen-Sonden für alle 24 menschlichen Chromosomen, welche nach einem definierten Schema einfach bzw. mehrfach mit Fluorochromen markiert sind. Durch die Mehrfachmarkierung entstehen dann Mischfarben.

Zentromerspezifische Sonden

Im Zentromerbereich aller menschlichen Chromosomen ist eine hochrepetitive DNA-Fraktion zu finden, die als Alpha-Satelliten-DNA bezeichnet wird. Diese DNA-Fraktion ist weitgehend spezifisch für die Zentromere der einzelnen Chromosomen, wobei durchaus Sequenzhomologien zu finden sind. Mit fluoreszenzmarkierten Alpha-Satelliten-DNA-Sonden lässt sich diese chromosomale Region spezifisch anfärben (Lee *et al.*, 1997).

Painting-Sonden

Mit *painting*-Sonden lassen sich ganze Chromosomen (*whole-chromosome-painting* (*wcp*)) (Speicher *et al.*, 1996; Senger *et al.*, 1997) oder selektiv einzelne Bereiche entsprechender Chromosomen (*partial-chromosome-painting* (*pcp*)) (Bates *et al.*, 1986) anfärben. Mittels dieser Sonden können interchromosomale Veränderungen, wie z.B. Translokationen, näher bestimmt werden, da durch Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome die Translokationspartner eindeutig zu bestimmen sind.

Intrachromosomale Veränderungen, wie z.B. Inversionen, sind mittels *painting*-Sonden nicht oder nur eingeschränkt charakterisierbar.

FISH-Banding-Verfahren

FISH-Bänderungsverfahren sind proteinvermittelte Methoden, mit denen DNA-spezifische Chromosomenbänderung durchgeführt werden können.

Das MCB (*multi color banding*) ist das am häufigsten in der Literatur beschriebene FISH-Bänderungsverfahren und basiert auf der Anwendung von chromosomen-

regionenspezifischen DNA-Banken, welche durch Mikrosezierung gewonnen wurden. Dieses Verfahren wurde erstmals 1999 für Chromosom 5 etabliert (Chudoba *et al.*, 1999). Für jedes Chromosom existiert eine, je nach Größe des Chromosoms, bestimmte Anzahl von DNA-Banken, welche in einer jeweils unterschiedlichen Farbe markiert wird. Gemeinsam auf das Ziel-Chromosom hybridisiert, ergibt sich ein spezifisches und reproduzierbares Bandenmuster. Dieses kann anhand der Mischfarbanteile, welche u. a. in den Überlappungsbereichen der einzelnen Banden entstehen, mittels Computersoftware in ein hochauflösendes Falschfarb-Bandenmuster umgerechnet werden, welches in seiner Auflösung der GTG-Bänderung vergleichbar oder sogar überlegen ist (Nelle, 2005; Liehr *et al.* 2006). Durch diese Kombination von DNA-Sonden aus unterschiedlichen Chromosomenbereichen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konnten erstmals intrachromosomale Veränderungen, wie z.B. Inversionen, Translokationen, Duplikationen oder interstitiellen Deletionen (z.B. Starke *et al.*, 2001; Kuchler *et al.*, 2001; Weise *et al.*, 2002) nachgewiesen und die exakten Bruchpunkte bestimmt werden.

Weitere FISH-Bänderungsverfahren sind beispielsweise der *chromosomal bar code* (Lengauer *et al.*, 1992 und 1993) und der RX-FISH (*cross species color banding*, Müller *et al.*, 1998). Beim *chromosomal bar code* wurden zur Abdeckung YAC Proben (*yeast artificial chromosome*) mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und anschließend auf die Ziel-DNA hybridisiert. Beim RX-FISH werden Ganzchromosomensonden vom Gibbon (Hylobatidae) auf humane Chromosomen hybridisiert. Durch evolutionär zu begründende Unterschiede im Karyotyp kommt es zur Anfärbung von Teilbereichen und letztlich zu einer Art Bänderung.

Mittlerweile sind FISH-Bänderungsverfahren wie das MCB eine wichtige Säule der Molekularzytogenetischen Forschung und Diagnostik und werden beispielsweise in der Bruchpunktcharakterisierung chromosomaler Rearrangements eingesetzt.

1.5 Stand der Forschung zur Zellkernarchitektur

Zellkerne menschlicher peripherer Blutlymphozyten haben einen Durchmesser von etwa 5 - 10 μm . Ihr Volumen wird mit einer Kugel von 500 μm^3 verglichen (Carmo-Fonseca *et al.*, 1996). Innerhalb der verschiedenen Gewebe bestehen jedoch morphologisch gravierende Unterschiede. So ist der Zellkern von Granulozyten gelappt (Bartova *et al.*, 2001), der von Fibroblasten sehr flach und oval. So gut die äußere Form und Struktur von Zellkernen der verschiedenen Gewebe untersucht ist, so groß sind die Unklarheiten, die über die Anordnung und Struktur ihrer inneren Bestandteile, der Chromosomen, bestehen. Seit den 1980er Jahren ist die Organisation der Chromosomen im Interphasezellkern von verstärktem Interesse. Seitdem wurden verschiedene Theorien zu diesen Fragestellungen diskutiert.

1.5.1 Theorien der Chromosomenarchitektur

Experimentelle Hinweise darauf, dass Chromosomen im Zellkern bestimmte Territorien mit speziellen biochemischen und/oder genetischen Eigenschaften (Zorn *et al.* 1976; Stack *et al.* 1977; Zorn *et al.* 1979; Cremer T. *et al.* 1982b) einnehmen, existieren schon seit den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts. Allererste Überlegungen darüber, dass Chromosomen bestimmte Regionen des Zellkernes zugeordnet sind, formulierte bereits 1885 Carl Rabl. 1909 veröffentlichte Theodor Boveri seine „Theorie der Chromosomenindividualität“ (Boveri, 1909). Ein Teil dieser Theorie besagte, dass jedes Chromosom einen Teil des *Nucleus* ausfüllt, ohne sich mit einem anderen Chromosom zu durchmischen.

Durch die Entwicklung der ersten Elektronenmikroskope Mitte der 1950er Jahre wurde diese Theorie jedoch zunächst wieder in Frage gestellt, da mit solcher Technik zwar Euchromatin und Heterochromatin voneinander abgrenzbar waren, einzelne Chromosomen sich aber nicht unterscheiden ließen (Comings, 1968; Comings *et al.*, 1970). Weitere Untersuchungen, basierend auf unterschiedlichsten experimentellen Ansätzen, festigten aber letztendlich die Theorie der Chromosomenterritorien.

Anhand von UV-mikrobestrahlten Hamsterzellen (Cremer *et al.*, 1974; Zorn *et al.*, 1979; Cremer *et al.*, 1982a), welche nach der Bestrahlung radioaktiv markiert worden waren, fanden sich in folgenden Zellteilungen durch das Muster der Markierung Hinweise auf eine territoriale Verteilung der Chromosomen.

Mitte und Ende der 1980er Jahre durchgeführte Untersuchungen mit *in situ* Hybridisierungen von radioaktiven oder fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden für gesamtgenomische DNA lieferten weitere Hinweise für die Richtigkeit der Territorientheorien (Manuelidis, 1985; Schardin *et al.*, 1985; Pinkel *et al.*, 1986).

Diese, sowie Untersuchungen, welche sich der neu entwickelten FISH-Technik unter Einsatz von *painting*-Sonden bediente (Cremer *et al.*, 1988; Lichter *et al.*, 1988; Pinkel *et al.*, 1988), brachten Erkenntnisse, aus welchen verschiedene Theorien zur Anordnung der Chromosomenterritorien formuliert wurden.

Radiale Anordnung der Chromosomen in der Interphase

Grundlage dieser Theorie war die Annahme, dass sich von der Chromosomenaufspreitung in Metaphaseplatten die Anordnung der Chromosomen im Zellkern ableiten lässt (Warburton *et al.*, 1973; Hens *et al.*, 1982; Wollenberg *et al.* 1982). Da solche, meist aus Blutlymphozyten gewonnenen Präparate, einer intensiven Behandlung mit Fixativ (Methanol und Eisessig), Colcemid und hypotoner Kaliumchloridlösung unterzogen werden, wurde jedoch auch diskutiert, dass diese Prozedur einen Einfluss auf die Anordnung der Chromosomen haben könnte (Sperling und Ludtke, 1981; Wollenberg *et al.*, 1982). Trotz dieser Kritikpunkte war jedoch erkennbar, dass kleinere Chromosomen radial näher zum Zentrum angeordnet waren als größere Chromosomen. Untersuchungen an mittels Formaldehyd fixierten menschlichen Fibroblasten bestätigten diese radiale Anordnung (Mosgöller *et al.*, 1991; Leitch *et al.*, 1994), besonders dadurch, da sie durch die Fixierung nicht artifiziell gespreitet waren.

Anordnung der Chromosomen in Prometaphaserosetten

In der Prometaphase sind die Chromosomen bereits kondensiert und ordnen sich bei 2-dimensionalen Untersuchungen in einer Ebene ringförmig an. Chaly und Brown konnten anhand von HeLa-Zellen, 3T3-Fibroblasten und Mitogen-aktivierten Mauslymphozyten mittels einer Anti-Zentromer-Färbung für diese Anordnung zeigen, dass alle Zentromere nach innen, alle Telomere nach außen zeigen (Chaly und Brown, 1988).

Anordnung der homologen Chromosomen (Homologenassoziation)

Die homologen Chromosomen liegen bei der Homologenassoziation nebeneinander. Diese Anordnung wurde als typische Eigenschaft in Zellkernen somatischer Zellen von *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) beschrieben (Hiraoka *et al.*, 1993; Henikoff, 1997). Verschiedene Arbeiten zu diesem Thema zeigten, dass Homologenassoziation beim Menschen nur in neuronalen Zellen (Arnoldus *et al.*, 1989; Arnoldus *et al.*, 1991) zu finden ist. Für Fibroblasten (Emmerich *et al.*, 1989; Leitch *et al.*, 1994), Amnionzellen (Popp *et al.*, 1990; Volm, 1992) und peripheren Blutlymphozyten (Ferguson und Ward, 1992; Vourch *et al.*, 1993; Lesko *et al.*, 1995) konnte diese territoriale Anordnung nicht oder nur in einer statistisch nicht signifikanten Zellzahl beschrieben werden.

1.5.2 Neuere Untersuchungen zur Chromosomenarchitektur im Interphasekern

Nachdem mit Quellungs- und Färbeexperimenten Chromosomen als anfärbbare Körper 1879/80 (Arnold und Flemming, 1879, 1880) mit Lokalisation im Kern einer jeden Zelle entdeckt und beschrieben wurden, blieb die Frage lange unbeantwortet, wie ihre Struktur und Lage während der Interphase beschaffen ist. Bis heute ist es allgemeine Lehrmeinung, dass Interphasechromosomen als coporale Form nicht existieren, sondern als mehr oder weniger dekondensierter DNA-Faden im Interphasekern vorliegen (Cornings, 1968). Die Theorie der Chromosomenterritorien ist bei diesen Überlegungen nicht involviert.

Neuere Arbeiten geben jedoch Grund zu der Vermutung, dass Interphasechromosomen eine Struktur aufweisen, welche weitgehend der der Metaphasechromosomen entspricht. Mit Hilfe eines FISH-Bänderungsverfahrens (MCB, siehe 1.4.2), exemplarisch für Chromosom 5, konnte anhand von synchronisierten Lymphozyten und Zellen der HeLa-Zelllinie gezeigt werden, dass in allen Phasen der Interphase ein Chromosomen-Bänderungsmuster erzielt werden kann, welches dem der Metaphase entspricht (Lemke *et al.*, 2002). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Interphasechromosomen immer eine sehr randständige Position einnehmen (Weise *et al.*, 2002).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Basierend auf Arbeiten zur Chromosomenstruktur im 2D-Interphasekern (Lemke *et al.*, 2002) war es das Ziel dieser Arbeit, ein Verfahren zu etablieren, welches die Möglichkeit eröffnet, verschiedene Gewebe präparativ so aufzuarbeiten, dass die naturnahe dreidimensionale Struktur der Zellkerne dieser Gewebe erhalten bleibt. Des Weiteren sollten diese Gewebe nach erfolgreicher dreidimensionaler Präparation für verschiedene FISH-Färbeverfahren zugänglich sein, um sie anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersuchen und mittels Computersoftware dreidimensional rekonstruieren zu können.

Da das nahezu einzige 3D-Präparationsverfahren sich ausschließlich auf die Verwendung von Fibroblasten stützt (Solovei *et al.*, 2002a), war es Ziel dieser Arbeit, mehr Zellen und Gewebe der molekularzytogenetischen Routine für dreidimensionale Analysen zugänglich zu machen.

Außerdem sollte das Verfahren mit keinem wesentlich erhöhten Aufwand als die Routine-Molekularzytogenetik betrieben werden können. Da in der molekularzytogenetischen Diagnostik neben suspendierten Zellen (Lymphozyten, Amnionzellen, Spermien) auch in seltenen Fällen solide Gewebe, wie z.B. Tumoren untersucht werden, sind zweierlei Methoden nötig.

Mit den entwickelten Methoden sollen zukünftig eine Reihe Fragestellungen untersucht werden, welche sich mit interchromosomalen Rearrangements in der sich nicht teilenden Zellfraktion beschäftigen.

II. Material und Methoden

2.1 Das Untersuchungsmaterial und seine Aufarbeitung

Für die Durchführung der verschiedenen Analysen wurden sowohl menschliche Lymphozyten aus peripher-venösem Blut als auch humane Zelllinien mit definierten Veränderungen verwendet. Die Zelllinien wurden von der ECACC (<http://www.ecacc.org.uk>) bezogen. Außerdem wurden histologische Schnitte von Lymphknoten für einige Untersuchungen verwendet.

2.1.1 Kultivierung der verwendeten Zellen

2.1.1.1 Kultivierung von Lymphozyten

Verwendete Lösungen

A. dest.

Bei allen verwendeten Lösungen (außer für die PCR) wurde organisch reines, partikelfreies und entionisiertes Reinstwasser mit Seralpur DELTA (Seral®) verwendet. Dieses wurde vor Gebrauch autoklaviert.

Wachstumsmedium

RPMI 1640 mit Glutamax-Zusatz

Enthält: fetales Kälberserum (Biochrom KG) 12 %, L-Alanin, L-Glutamin (GibcoBRL®), Streptomycin (1000 U/ml; Biochrom KG) 1 % und Penicillin (1000 U/ml).

Phytohämagglutinin (PHA)

Lyophilisiertes PHA (Seromed®) wurde in 5 ml A. dest. (Ampuva®, Fresenius®) gelöst und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

KCl-Lösung

Aus kristallinem KCl (Merck®) wurde mit A. dest. eine 0,56%ige Lösung hergestellt.

Fixativ

Gemisch aus Methanol (Merck®) und Eisessig (Merck®) im Mischungsverhältnis 3:1

Kultivierung des Zellmaterials

Zur Kultivierung von Blutlymphozyten nach Standardprotokoll (Verma und Babu 1994) wurde heparinisiertes Vollblut verwendet. Dieses wurde 72h bei 37°C und einer CO₂-Sättigung von 5 % in einer sterilen Kulturflasche (Cellstar®, Greiner®) kultiviert. Unter Verwendung von RPMI 1640 als Kulturmedium und Phytohämagglutinin wurde das Wachstum von T-Lymphozyten gezielt stimuliert. Auf die Arretierung der Zellen in der Metaphase mittels Colchizin wurde verzichtet um möglichst viele Interphasekerne zu erhalten.

Zellpräparation

Nach dem Kultivieren der Probe wurde sie unter leichtem Schütteln der Kulturflasche in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und anschließend für 15 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der dann erkennbare Überstand wurde verworfen. Zur notwendigen Lyse der Erythrozyten wurde 37°C warme KCl-Lösung als hypotones Medium hinzugegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Der eigentliche Schritt der Hämolysen erfolgte durch Zugabe von 1 – 2 ml gekühltem Fixativ.

Die sich anschließende Zentrifugation erfolgte unter den gleichen Parametern wie die vorige. Nachdem der Überstand wieder abgesaugt und verworfen wurde, wurde das Zellsediment mit 10 ml Fixativ gewaschen und wieder zentrifugiert. Diese Schritte wiederholten sich noch zweimal bis eine klare lymphozytenhaltige Suspension entstanden war. Diese wurde zur vollständigen Denaturierung der Proteine mindestens 45 min, besser aber über Nacht bei –20°C, inkubiert. Dann wurde abschließend nochmals bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen dann in frischem Fixativ resuspendiert. Die Menge des Fixativs richtet sich dabei nach der Zelldichte in der Suspension, beträgt aber mindestens 1 ml. Die Suspension kann ohne schwerwiegenden Qualitätsverlust im Fixativ bei –20°C über Jahre gelagert werden, da bei dieser Temperatur der depurinierende Effekt der im Fixativ enthaltenen Essigsäure gering gehalten wird.

2.1.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Verwendete Lösungen

Siehe 2.1.1.1

Kultivierung des Zellmaterials

Die Kultivierung von Material aus Zelllinien erfolgte nach dem gleichen standardisierten Protokoll (Verma und Babu 1994) wie die Kultivierung von Blutlymphozyten (siehe 2.1.1.1). Im Unterschied zu dem o.g. Protokoll wurde dem Kulturansatz für Zelllinien jedoch kein Phytohämagglutinin zugesetzt.

Zellpräparation

Auch die Präparation der Zellen erfolgte in standardisierter Weise. Das Arretieren mit Colchizin wurde ebenfalls für eine höhere Ausbeute an Zellkernen nicht durchgeführt. Die sich anschließende Inkubation mit hypotoner KCl-Lösung, die Zentrifugationen und die Waschungen mit Fixativ wurden in der gleichen Weise durchgeführt, wie es in Abschnitt 2.1.1.1 ersichtlich ist.

2.1.2 Herstellung von Zellkern- und Chromosomenpräparaten

Ein Teil der Analysen vom Beginn der Arbeit wurden mit konventionell bzw. leicht modifiziert hergestellten Zell- und Chromosomenpräparaten durchgeführt.

Verwendete Stoffe und Lösungen

Fixativ

Gemisch aus Methanol (Merck®) und Eisessig (Merck®) im Mischungsverhältnis 3:1

Aufsteigende Ethanolreihe

mit *Aqua dest.* auf 70% und 95% verdünnter absoluter Ethanol (Merck®) und abschließendem Schritt absolutem Ethanol

Silicagel

Kristallines Siliziumdioxid (Merck®), hygroskopisches Trocknungsmittel, mit Kobaltchlorid (CoCl₂) als Indikator

Durchführung

Nachdem die Lymphozyten wie unter Abschnitt 2.1.1.1 genannt kultiviert und präpariert wurden, können sie im fixierten Zustand zur Herstellung von Trockenpräparaten genutzt werden. Hierzu waren Objektträger zu verwenden, welche zuvor mit Seidenpapier von Fettverunreinigungen befreit wurden. Auf diese wurde die Zellsuspension aufgetropft und anschließend nochmals mit reinem Fixativ nachgetropft. Anschließend wurden dann, für die standardisierte Chromosomenpräparation in eine feuchte Kammer gestellt.. Diese Präparation wurde für die Herstellung von dreidimensionalen Kernpräparaten dahingehend modifiziert, dass das Auftropfen der Suspension bei einer Luftfeuchte von nahezu 0% erfolgte, um der unter Normalbedingungen erfolgenden Quellung vorzubeugen.

Nachdem das Fixativ nach dem Auftropfen verdampft war, wurden die Objektträger bei beiden Präparationen in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend getrocknet. Zur Trocknung bei 0% Luftfeuchte wurde ein abgeschlossenes System mit Silicagel bzw. Silicagel und Vakuumerzeugung verwendet.

2.1.3 Herstellung der histologischen Schnitte

Die bei einigen Analysen zur Entwicklung einer 3D-Hybridisierung eingesetzten Lymphknoten-Schnitte fertigte Herr Prof. G. Jirikowski vom Institut für Anatomie Jena an und stellte sie freundlicherweise zur Verfügung.

Verwendete Lösungen

Paraformaldehyd

4%-ige Lösung von Paraformaldehyd-Pulver (Sigma[®])

PBS

0,1 m Lösung (Biochrom KG[®]), auf pH 7,2 mit 1 n HCl einstellen

Natriumchlorid-Lösung

0,9% Lösung von kristallinem NaCl (Roth[®]) und A. dest. (Seral[®])

Aufsteigende Ethanolreihe

Reihe von Ethanol (Merck®), welcher mit A. dest. auf 50%, 70%, 90% verdünnt wurde

Acetonitril

Organisches Lösungsmittel (Merck®) als Intermedium

EPON 812

Harz (künstlicher Bernstein) aus 4 Komponenten (Fluka®)

EPON 812	13,0g
DDSA	4,9g
MNA	8,9 g
DMP 30	0,8g

Acrylamid

Kristalline Trockensubstanz (Sigma®)

Durchführung

Das Gewebepräparat wurde zunächst in einer Mischung aus Paraformaldehyd, PBS und isotoner (0,9%iger) Kochsalzlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Eine sich anschließende Ethanol-Reihe bestehend aus 50%, 70%, 90% und 100% Ethanol wurde zur Dehydrierung des Präparates durchgeführt. Hierbei musste das Gewebepräparat für jeweils 15 min in der jeweiligen Ethanol-Stufe inkubiert werden. Die 100%-Stufe war dreimal zu durchlaufen. Anschließend wurde das Gewebe in Acetonitril als Intermedium auf die Einbettung vorbereitet. Die Einbettung geschah mit EPON 812. Dies ist eine Kombination aus 4 Komponenten und entspricht künstlichem Bernstein. Das EPON 812 wurde als erste Stufe im Verhältnis 1:5 mit Acrylamid gemischt und das Gewebe darin inkubiert, dann im Verhältnis 1:3 und schließlich im Verhältnis 1:1.

Als abschließenden Schritt der Einbettung wurde das Präparat in reines Kunstharz eingegossen und bei 55°C für drei Tage polymerisiert. War das Harz nach dieser Zeit ausgehärtet, wurde es semidünn (0,1 µm) mit dem Ultramikrotom (Ultracut,

Reichert[®]) geschnitten. Die Einzelschnitte wurden anschließend auf einen Objektträger aufgetrocknet.

2.2 Vorbehandlung der Zellpräparate

2.2.1 Vorbehandlung der Kern- und Chromosomenpräparate

Vor der Hybridisierung von DNA-Sonden auf Chromosomen und Zellkernen, die auf Objektträgern aufgetropft und getrocknet wurden, bestand die Notwendigkeit einer Reihe von Schritten zur Vorbereitung.

2.2.1.1 Pepsinverdau und Postfixierung

Verwendete Lösungen

Pepsinstammlösung

1 g Pepsin (Sigma[®]) auf 50 ml *A. dest.*

1x PBS

Lösung von 9,55 g/l PBS (Biochrom KG[®]); 47,75 g auf 5 l *Aqua dest.*

Postfixierungs-Lösung

1%ige Paraformaldehydlösung, gelöst in 1 x PBS mit 50 mM MgCl₂
(500 µl Paraformaldehyd + 450 µl 1 x PBS + 50 µl MgCl₂)

Aufsteigende Ethanolreihe

mit *Aqua dest.* auf 70% und 95% verdünnter absoluter Ethanol (Merck[®]) und abschließendem Schritt absolutem Ethanol

Durchführung

Um Plasmareste, welche sich noch um Kerne und Metaphasechromosomen befanden, zu entfernen, musste ein Pepsinverdau durchgeführt werden. Dadurch wurde die chromosomale DNA für die DNA-Sonden besser zugänglich gemacht. Hierfür wurde eine 10 mM HCl-Lösung aus 95 ml *Aqua dest.* und 5 ml 0,2 n HCl-Lösung hergestellt und auf 37°C vorgewärmt. War diese Temperatur erreicht, fügte man der Lösung 500 µl der Pepsinstammlösung zu. Darin wurden die Objektträger

bei 37°C für 5 min inkubiert. Anschließend musste in 1xPBS für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen werden. Zur Stabilisierung des Materials schloss sich ein Schritt zur Postfixierung an. Hierfür wurden 100 µl der Postfixierungs-Lösung auf den Objektträger gegeben, mit einem Deckglas 24x60 mm eingedeckelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Deckglases wurde der Objektträger wieder für 5 min in 1xPBS bei Raumtemperatur gewaschen. Vor der abschließenden Ethanol-Reihe musste der Objektträger kurz mit Aqua dest. gespült werden, da der PBS-Puffer in Verbindung mit Ethanol ausfällt und das entstehende Salz den Objektträger verunreinigen würde.

Die abschließende Alkohol-Reihe wurde für jeweils 3 min bei Raumtemperatur mit 70%-igem, 95%-igem und absolutem Ethanol durchgeführt.

2.2.1.2 Denaturierung der Objektträger

Damit die DNA-Sonden überhaupt an die Ziel-DNA binden können, musste diese zunächst denaturiert werden.

Verwendete Lösungen

20x SSC-Lösung

Lösung von 87,65 g NaCl, 44,10 g Natriumcitrat auf 500 ml *Aqua dest.*, gebrauchsfertig

70%ige Formamid-Lösung

140 ml Formamid + 40 ml *Aqua dest.* + 20 ml 20 x SSC

Aufsteigende Ethanolreihe

Reihe von Ethanol (Merck®) welcher mit *A. dest.* auf 70% und 95% verdünnt wurde, der 70%-ige Ethanol ist auf -20°C gekühlt, abschließender Schritt mit absolutem Ethanol

Durchführung

Der Objektträger wurde auf der Heizplatte auf ca. 72°C vorgewärmt. Dann musste 100 µl von der 70%-igen Formamid-Lösung darauf gegeben und mit einem Deckglas 24x60 mm abgedeckt werden. Die Denaturierung der Objektträger erfolgte für 3 min bei 72°C. Nach dem Entfernen der Deckglases, musste der OT sofort für 3 min im

70%-igen Ethanol dehydriert werden. Um eine schnelle Renaturierung der DNA zu verhindern, war der Ethanol dieses ersten Schrittes der Alkohol-Reihe auf -20°C gekühlt. Die anderen beiden Schritte erfolgten wieder bei Raumtemperatur. Nach der Trocknung des Objektträgers, war er bereit für die Hybridisierung.

2.2.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

2.2.2.1 Entfernung des Kunstharzes

Um auf den Einzelschnitten der Lymphknotenpräparate DNA-Sonden hybridisieren zu können, musste das Epoxyd-Harz, in welches diese eingebettet waren, herausgewaschen werden.

Verwendete Lösungen

Natrium-Methylat-Lösung

10%-ige Lösung von Na-Methylat (Sigma[®])

1xPBS

Lösung von 9,55 g/l PBS (Biochrom KG[®]); 47,75 g auf 5 l *Aqua dest.*

Durchführung

Das Kunstharz für die Einbettung des Gewebes musste vor einer Hybridisierung mit DNA-Sonden aus dem Präparat herausgelöst werden, da es für FISH-Färbetechniken nicht permeabel ist. Hierzu wurde der Objektträger mit den aufgetrockneten Schnitten für 10 s in Natrium-Methylat-Lösung inkubiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen.

2.2.2.2 Pepsinverdau und Denaturierung der Gewebeschnitte

Ein Pepsinverdau des Gewebematerials war nicht notwendig, da durch die Semidünnschnitt-Technik die chromosomale DNA für DNA-Sonden zugänglich gemacht wurde. Auch der Denaturierungsschritt brauchte nicht durchgeführt zu werden, da Bestandteile (Propylenoxid) des Kunstharzes eine denaturierende Wirkung haben.

2.2.3 Vorbehandlung der S-FISH-Präparate

2.2.3.1 Waschung und Rehydrierung

Verwendete Lösungen

Methanol

Lösung von absolutem Methanol (Merck®)

Absteigende Ethanol-Reihe

Reihe von Ethanol welcher mit *A. dest.* auf 90%, 70%, 50%, 30% und 10% verdünnt wurde

Natriumchlorid-Lösung

0,9% Lösung von kristallinem NaCl (Roth®) und *A. dest.* (Seral®)

Rehydrierung der Zellpräparate

Die in Fixativ bei –20 °C gelagerte Zellen mussten vor der weiteren Behandlung vom Fixativ befreit und anschließend rehydriert werden. Dazu wurde die Zellspuspension bei 4 °C für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Nun wurde das Sediment einmal mit 0,5 – 1 ml (je nach Zelldichte) Methanol für 2 min bei RT inkubiert. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei gleichen Parametern an. Der Überstand wurde wieder verworfen. Im nächsten Schritt mußten die Zellen mit 500 µl isotoner Kochsalzlösung gewaschen und rehydriert werden.

Bei wenig Zellmaterial oder empfindlicheren Zellen (z.B. Amniozyten; wurden in dieser Arbeit nicht verwendet) erfolgte alternativ die Durchführung einer absteigenden Ethanol-Reihe von jeweils 500 µl anstelle des einzelnen Schrittes mit Methanol vor der Rehydrierung mit isotoner Kochsalzlösung durchgeführt.

2.2.3.2 Pepsinverdau und Denaturierung bei S-FISH

Verwendete Lösungen

Pepsinlösung

Lösung von 1 % 1 n HCl und 0,5 % Pepsin-Stammlösung (= 1 g Pepsin (Sigma®)) auf 50 ml A. dest.)

Isotone Kochsalzlösung

0,9% Lösung von kristallinem NaCl (Roth®) und A. dest. (Seral®)

Durchführung des Pepsinverdau

Um Reste des Zytoplasmas, welche sich noch um die Kerne befinden, zu entfernen, wurde ein Pepsinverdau durchgeführt. Dies war notwendig, damit DNA-Sonden in späteren Analyse-Schritten besser in das Innere des Nukleus gelangen können.

Hierfür wurden die Zellkerne, welche sich jetzt in isotoner Kochsalzlösung befinden, wie o. g. zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde 500 µl der Pepsin-Lösung (475 µl A. dest. + 25 µl 1n HCl + 5 µl 0,5% Pepsin-Stammlösung) mit den Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert. Die folgende Zentrifugation musste ebenfalls bei 4°C durchgeführt werden, um die Wirkung des Pepsins thermisch zu beenden.

Denaturierung der intranukleären DNA

Zunächst wurde die Zellsuspension nach der letzten Zentrifugation wie o.g. isoton umgepuffert. Es folgte eine erneute Zentrifugation und die Abnahme des Überstandes. Dabei wurde das Puffer-Volumen, in welchem sich die Nuklei befinden, von ca. 500 µl auf etwa 50 µl reduziert. Zur Denaturierung musste die nun höher konzentrierte Zellsuspension in ein 500-µl-Eppendorf-Gefäß überführt werden. Die eigentliche Denaturierungsreaktion erfolgte bei 95°C für 5 min. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß sofort auf 4°C gekühlt, um einer raschen Renaturierung der DNA entgegenzuwirken. Zur Vereinfachung und besseren Reproduktivität wurden beide Schritte automatisiert in einem Cycler (PTC-200, MJ Research®) durchgeführt.

2.3 Die DNA-Sonden, ihre Herstellung und Vorbereitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chromosomenspezifische DNA-Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eingesetzt. So fanden kommerzielle Zentromer-spezifische Sonden (Vysis®) ebenso Anwendung wie einige Sonden, die mittels Mikrosezierung (Rubtsov *et. al*, 1996) im Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena hergestellt wurden. Dies waren Ganz- und Teilchromosomen-Sonden (*painting*-Sonden) sowie Multicolor-Banding-Sonden.

2.3.1 Kommerzielle Zentromersonden

Es wurden Sonden der Firma **Vysis®** (jetzt Firma **ABBOTT®**) eingesetzt. Sie kamen aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Grösse und guten Hybridisierungseigenschaften bei Tests während der Entwicklung der 3D-Techniken zum Einsatz und wurden willkürlich ausgewählt.

Es wurde folgende Kombination von Sonden verwendet:

Zentromersonde Chr. 6 (cep 6 Vysis®)	Spectrum Green
Zentromersonde Chr. 16* (cep 16 Vysis®)	Spectrum Orange
Zentromersonde Chr. 18 ⁺ (cep 18 Vysis®)	Spectrum Aqua
Zentromersonde Chr. X ⁺ (cep X Vysis®)	Spectrum Orange
	Spectrum Green
	Spectrum Aqua
Zentromersonde Chr. Y ⁺ (cep Y Vysis®)	Spectrum Orange

*Die Sonde für das Zentromer 16 ist keine Zentromersonde im eigentlichen Sinn, sondern eine Sonde, welche spezifisch den sich an das Zentromer direkt anschließenden Heterochromatinbereich im Bereich 16q11.2 anfärbt.

*Diese drei Sonden sind kombiniert als *AneuVision*, Vysis® kommerziell erhältlich.

Vorbereitung, Hybridisierung und Posthybridisierungswaschungen

Das folgende Schema wurde für den Hybridisierungsansatz und die Vorbereitung der Sonden nach Herstellerangaben für den Einsatz auf Metaphasechromosomen auf Normal-Objektträgern verwendet:

1. Sondenpräparation	2. Sondendenaturierung	3. Posthybridisierungs- waschung
1 µl CEP Sonde + 2 µl Wasser + 7 µl Hybridisierungs-puffer	5 min bei 72°C dann 4°C <i>for ever</i> (zur Verhinderung der schnellen Renaturierung)	2 min /68°C in 0,4xSSC 1 min /RT in 4x SSCT Alkoholreihe

Bei dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten S-FISH-Protokoll wurde dieses Schema folgendermaßen modifiziert:

1. Sondenpräparation	2. Sondendenaturierung	3. Posthybridisierungs- waschung
4 µl CEP Sonde +16 µl Hybridisierungs-puffer	5 min bei 72°C dann 4°C <i>for ever</i> (zur Verhinderung der schnellen Renaturierung)	2 min /68°C in 0,4xSSC 1 min /RT in 4x SSCT

2.3.2 Durch Mikrosezierung gewonnene Sonden

2.3.2.1 Technik der Mikrosezierung (modifiziert nach Rubtsov *et al.*, 1996)

Bei der Mikrosezierung wurde unter Zuhilfenahme einer ausgezogenen Glasnadel aus einem Giemsa-gebänderten Metaphasechromosom ein definiertes Stück herausgeschnitten. Durch eine sich anschließende Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) konnte das entsprechende Material amplifiziert werden. Es stand dann für weitere Schritte, wie z.B. einer Markierungs-PCR (siehe 2.3.3.1.) zur Verfügung und konnte als DNA-Sonde eingesetzt werden. Die Technik der Mikrosezierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht angewandt. Die verwendeten Sonden wurden in der Arbeitsgruppe Molekulare Zytogenetik hergesellt und standen für diese Arbeit zu Verfügung.

2.3.2.2 Ganz-(wcp) und Teilchromosomen-(pcp)-painting-Sonden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ganz- und Teilchromosomensonden verwendet, die im Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena durch Frau Dr. G. Senger und Frau Dr. I. Chudoba hergestellt worden waren. Diese Sonden standen für alle menschlichen Chromosomen zur Verfügung.

2.3.2.3 Multicolor-Banding-Sonden (MCB)

Beim MCB wurden regionenspezifische Mikrosezierungsbanken zu chromosomenspezifischen Sonden-Sets zusammengefasst. Dies wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena durchgeführt. Damit stand zu Beginn der Arbeit für alle menschlichen Chromosomen ein FISH-Bänderungsverfahren zur Verfügung (Liehr *et al.*, 2002a).

2.3.3 Markierung, Vorbereitung und Hybridisierung der Mikrosezierungs-Sonden

2.3.3.1 Markierungs-PCR (*labelling*-PCR)

Die Mikrosezierungs-Sonden wurden in einer PCR nach einem, für das jeweilige Chromosom feststehenden Schema, mit Fluorochromen oder Haptenen, welche in Form modifizierter Nucleotide (SpectrumGreenTM-dUTP, SpectrumOrangeTM-dUTP, TexasRedTM-dUTP, Diethylaminocumarin und Biotin-16-dUTP) vorlagen, markiert.

Verwendete Lösungen

Steriles Wasser (*Aqua ad iniectabilia*)

H₂O (Ampuwa) von Braun[®], steril und pyrogenfrei

GeneAmp[®]-10x-PCR-Puffer-II

GeneAmp[®]-10x-PCR-Puffer-II (Perkin Elmer[®]) 100 mM Tris-HCl; pH 8,3; 500 mM KCl

DOP-Primer

Sequenz: 5'CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'

Der verwendete degenerierte Oligonukleotid-Primer wurde im Institut f. Virologie Jena von Dr. Birch-Hirschfeld synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Stammlösung: 40 µM Endkonzentration: 5 µM

Amplitaq[®] DNA-Polymerase

Perkin Elmer[®], thermostabil, Konzentration: 5 U/µl

Magnesiumchlorid (MgCl₂)

Stammlösung: 25 mM Endkonzentration: 2,5 mM

Nukleotide (label-mix)

GeneAmp[®]-dNTP's (Perkin Elmer[®]), Lösung von 2 mM dATP, dCTP, dGTP und 1 mM dTTP.

Die Konzentration von dTTP war geringer gewählt worden, da an seiner Stelle die dUTP-gebundenen Fluorochrome bzw. Haptene in die DNA eingebaut wurden.

Fluorochrom	Hersteller	Absorptions-Maxima	Emissionsmaxima
Diethylaminocumarin-5-dUTP (DEAC)	NEN Life Science Products, Inc.	426 nm	480 nm
SpectrumGreen TM -dUTP (SG)	Vysis [®] (jetzt ABBOTT [®])	497 nm	524 nm
SpectrumOrange TM -dUTP (SO)	Vysis [®] (jetzt ABBOTT [®])	559 nm	588 nm
ChromaTide-TexasRed-12-dUTP (TR)	Molecular Probes [®]	595 nm	615 nm
Biotin-16-dUTP*	Boehringer Mannheim [®]	649 nm**	670 nm**

Tab. 1 Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

*Bei der Markierungs-PCR wurde Biotin-16-dUTP anstelle eines Fluorochroms verwendet. An dieses Hapten wurde in einem Detektionsschritt (siehe 2.4.4.1.) das Fluorochrom Strept-Avidin-Cy5 gebunden, welches die in Tab. 1 angegebenen (mit ** markiert) Absorptions- und Emissionsspektren besitzt.

Ansatz einer Markierungs-PCR

Die genannten Lösungen wurden für die Durchführung der Markierungs-PCR nach folgendem Schema unter sterilen Bedingungen zusammenpipettiert. Die Mengen beziehen sich auf einen einfachen Ansatz für eine zu markierende DNA-Bank. Von dieser wurde bei der PCR 3 µl je einfachen Ansatz eingebracht. Bei mehrfachen Ansätzen waren die Mengen aller verwendeten Reagenzien entsprechend zu erhöhen.

Lösung	Endkonzentration	Menge pro einfachen Ansatz und Bank
H ₂ O (Ampuwa)		10,88 µl (bei SG, SO, TR) 12,08 µl (bei Biotin-dUTP) 12,48 µl (bei DEAC)
GeneAmp-Puffer	2x	2 µl
dNTP-Mix (<i>label-mix</i>)	1x	2 µl
MgCl ₂	2,5 mM	2 µl
DOP-Primer	2 µM	1 µl
Markierte Nukleotide		0,4 µl DEAC 0,8 µl Biotin-dUTP 2 µl SG, SO, TR
AmpliTaq®	5 U/µl	0,12 µl

Tab. 2 Lösungsmengen für Markierung einer einzelnen DNA-Bank

Durchführung der *labelling*-PCR

Nach der Zusammenführung aller genannten Lösungen in einem 500- μ l-Reaktionsgefäß (Eppendorf®), lief die PCR automatisiert in einem Thermocycler (PTC-200, MJ Research®) ab.

Dies geschah nach folgendem Schema im PCR-Programm „Label 30“:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Bedeutung
1	94 °C	3 min	Denaturierung
2	92 °C	1 min	Denaturierung
3	56 °C	1 min	<i>Annealing</i> (Bindung des Primers)
4	72 °C	2 min	Elongation
5	Erwärmung auf 74 °C bei 0,1 °C/s		
6	Zurück zu Schritt 2 für 29 weitere Zyklen		
7	72 °C	5 min	Elongation
8	4 °C	<i>for ever</i> (bis Beendigung des Programms)	Ende der PCR

Tab. 3 Übersicht über die einzelnen PCR-Schritte bei der DNA-Markierung

2.3.3.2 DNA-Fällung

Nach der Markierung der DNA mittels PCR war es notwendig, die DNA zu fällen um, sie z.B. von nicht gebundenen Nukleotiden zu reinigen. Anschließend wurde sie getrocknet und im Hybridisierungspuffer gelöst.

Verwendete Lösungen

Natrium-Acetat-Lösung 3M (bezogen auf Acetat)

24,6 g wasserfreies Natriumacetat (Sigma®) auf 100 ml *A. dest.* auffüllen, auf pH 5,2 mit Eisessig (Merck®) einstellen

E.coli tRNA

Roche[®], als Träger zur Erhöhung der Effektivität des Fällens, als Stammlösung (Konzentration 10 µg/µl) eingesetzt

Absolut Ethanol

Gebrauchsfertige Lösung (Merck[®])

Dextransulfat (DS)

Ansatz: 2 g DS

2 ml 20 x SSC

2 ml 0,5 M Natriumphosphat

5 ml deionisiertes Formamid

→ auf 10 ml mit *Aqua dest.* auffüllen

→ bei 70 °C ca. 3 Stunden lösen

Durchführung der DNA-Fällung

Für die Fällung des einfachen Ansatzes wurden dem PCR-Produkt 5 µl Natriumacetat, 10 µl tRNA und 110 µl absoluter Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde bei –80 °C mindestens 10 min oder bei –20 °C für mindestens 2 Stunden inkubiert. Danach wurde es bei 4 °C bei 15300 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand musste verworfen und das zurückbleibende Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet werden. Abschließend wurde die Probe in Dextransulfat gelöst. Hierbei wurden für Einzelproben 20 – 25 µl Dextransulfat verwendet, für Probenmische (z.B. MCB) 30 – 35 µl. Von diesem Mix konnte nun für die normale FISH etwa 5 µl pro Hybridisierungsansatz eingesetzt werden. Bei dem S-FISH-Protokoll waren jedoch mindestens 20 µl für einen Ansatz notwendig.

Die in Dextransulfat gelöste Probe kann bei –20 °C im Dunkeln gelagert werden (Sambrook und Maniatis, 1989).

2.4 Vorbereitung der Sonde und Hybridisierung

Verwendete Lösungen

COT-1-DNA (100 µg)

Je nach DNA-Menge in der Sonde wurde die jeweils benötigte Menge COT-1-DNA (1 mg/ml, GibcoBRL®) mit dem doppelten Volumen absolutem Ethanol versetzt und unter Vakuum oder bei 60 °C im Brutschrank eingetrocknet und bis zum Gebrauch bei –20 °C gelagert.

Durchführung

Die benötigte Menge Sonde (Standard-FISH 5 µl; S-FISH 20 – 25 µl) wurde zu der benötigten Menge getrockneter COT-1-DNA gegeben. Im Standard-FISH wurde zusätzlich noch mit 7 µl DS verdünnt, so dass 12 µl Sondenmix pro ½ Objektträger verwendet werden konnten. Das Standard-FISH-Protokoll kam bei Hybridisierungen auf herkömmlich getropften Objektträgern und auf Gewebeschnitten zum Einsatz. Um eine effektive Hybridisierung zu gewährleisten, mussten unspezifische repetitive Sequenzen in einem Prähybridisierungsschritt mit COT-1-DNA abgeblockt und die Sonden-DNA denaturiert werden.

Dies geschah in einem Thermocycler (PTC-200, MJ Research®) automatisiert nach folgendem Schema:

Temperatur	Dauer	Bedeutung
75 °C	5 min	Denaturierung
4 °C	2 min	Verhinderung rascher Renaturierung
37 °C	30 min	Blockierung der repetitiven Sequenzen mit COT-1-DNA

Tab. 4 Ablauf der Prähybridisierung

Die so vorbereitete Sonden-DNA wird nun zum Untersuchungsmaterial gegeben, welche wie oben beschrieben vorbereitet wurde. Beides wurde miteinander bei 37 °C für 24 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert (Hybridisierung).

2.4.1 Posthybridisierungswaschung, Detektion und Gegenfärbung

Um überschüssige, nicht gebundene Sonden-DNA vom Untersuchungsmaterial zu entfernen, schlossen sich an die Hybridisierung verschiedene Posthybridisierungswaschungen an. Wurden indirekt markierte Sonden verwendet, war ein Detektionsschritt notwendig. Am Ende erfolgte eine Gegenfärbung des Untersuchungsmaterials, um Grundstrukturen der Chromosomen bzw. Zellkerne lokalisieren zu können und die Fluoreszenzsignale vor zu schnellem Ausbleichen zu schützen.

Verwendete Lösungen

20x SSC

GibcoBRL[®], 3,0 M Natriumchlorid + 0,3 M Natriumcitrat

0,4x SSC

10 ml 20x SSC + 490 ml *Aqua dest.* auf pH 7,0 – 7,5 mit 1 n HCl einstellen

2x SSC

50 ml 20 x SSC + 450 ml *Aqua dest.* auf pH 7,0 – 7,5 mit 1 n HCl einstellen

4x SSC/Tw

100 ml 20x SSC + 400 ml *Aqua dest.* + 250 µl Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Sigma[®]), auf pH 7,0 – 7,5 einstellen mit 1 n HCl

SSCTM

0,25g fettfreie Trockenmilch (Marvel[®]) wird in 2 ml 4x SSC/Tw gelöst und anschließend bei 1500 U/min zentrifugiert um ungelöste Reste am Boden des Gefäßes zu konzentrieren

50%-ige Formamid-Lösung

Lösung aus 50 ml 20 x SSC + 200 ml *Aqua dest.* + 250 ml Formamid (Merck[®])

M = 45,04 g/mol, auf pH 7,0 – 7,5 mit 1 n HCl einstellen

1x PBS

Lösung von 9,55 g/l PBS (Biochrom KG[®]); 47,75 g auf 5 l *Aqua dest.*

Aufsteigende Ethanolreihe

mit *Aqua dest.* auf 70% und 95% verdünnter absoluter Ethanol (Merck®) und abschließendem Schritt absolutem Ethanol

Strept-Avidin-Cy 5

Amersham®, Lösung im Mischungsverhältnis 3:100 SSCTM

Isotone Kochsalzlösung

0,9% Lösung von kristallinem NaCl (Roth®) und *A. dest.* (Seral®)

DAPI/Antifade

ca. 0,25 % 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma®), Stocklösung: 50 µg/ml wird mit Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories®) ansetzen, ist bei 4 °C lichtgeschützt zu lagern

Agarose

SeaKem LE Agarose (FMC® BioProducts) zur Herstellung eines 1%-igen Geles

2.4.2 Durchführung von Waschung und Detektion bei der Standard-FISH

Je nach verwendeter Sonde wurde eine von zwei verschiedene Waschungen durchgeführt. Bei den kommerziellen Zentromersonden kam das von den Herstellern empfohlene *rapid wash* zum Einsatz. Dabei wurden die Objektträger in 0,4xSSC bei 66 – 68 °C für 2 min gewaschen. Daran schlossen sich ein Schritt mit 4xSSC/Tw für eine Minute und eine kurze Waschung mit 1xPBS auf dem Schüttler an. Vor der abschließenden aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte wieder kurz die Spülung mit *Aqua dest.*, um das Ausfallen des PBS-Salzes zu vermeiden. War der Objektträger im Dunkeln getrocknet, wurde er mit DAPI/*Antifade*-Lösung eingedeckt.

Bei den Mikrosezierungs sonden kam eine Lang-Waschtechnik zum Einsatz. Diese ist durch die Verwendung von anderen Lösungen und niedrigeren Temperaturen weniger stringent. Bei dieser Waschung wurde dreimal für 5 min bei 42 °C in 50%-iger Formamid-Lösung gewaschen. Daran schlossen sich drei Schritte mit 2xSSC bei 42 °C für jeweils 5 min an. Die Waschlösungen waren von einem Schritt zum nächsten zu verwerfen. Abschließend erfolgte nach dem letzten Schritt mit 2xSSC eine kurze Spülung in 4xSSC/Tw. Waren indirekt markierte Sonden

hybridisiert worden, musste nun zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen für die folgende Detektion mit Antikörpern mit SSCTM inkubiert werden. Dazu wurde der OT mit 100 µl SSCTM überschichtet, mit einem Deckglas 24x60 mm abgedeckt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Deckglases wurde wieder kurz in 4xSSC/Tw bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen. Zur Detektion der Antikörper wurden diese im o.g. Verhältnis in SSCTM gelöst und anschließend auf den OT gegeben. Mit einem Deckglas 24x60 mm abgedeckt, wurde der OT für ca. 40 min in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Überschüssige, nicht gebundene Antikörper konnten bei Raumtemperatur mit 4xSSC/Tw für zweimal 5 min und mit 1xPBS für 5 min auf einem Schüttler ausgewaschen werden. Abschließend wurde der OT wieder mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Um die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Ausbleichen zu schützen, erfolgte die Trocknung im Dunkeln. Vor der Betrachtung im Mikroskop wurde der OT genau wie bei den kommerziellen Sonden mit 20 µl DAPI/ *Antifade*-Lösung eingedeckt.

2.4.3 Herstellung einer fixierenden Gegenfärbung für S-FISH

Um Chromosomen in dreidimensionalen Zellkernen unter Verwendung von Mehrfarben-FISH-Sonden analysieren zu können, bedarf es einer DAPI/Antifade-Gegenfärbung, welche gleichzeitig das Zellmaterial auf dem Objektträger fixiert. Hierzu wurde ein DAPI-Agarose-Gel verwendet. Es erfolgte zunächst die Herstellung eines 1%-igen Agarosegels. Dazu wurden auf 25 ml 0,9%-ige Natriumchlorid-Lösung 0,25 g Agarose gegeben und bei 600 W für eine Minute in der Mikrowelle aufgelöst. Von diesem Stammgel wurde eine definierte Menge (z.B. 2 ml) abgenommen und mit der gleichen Menge DAPI-Lösung gemischt. Dazu wurde 1,5 µl *Antifade*-Lösung gegeben. Für die Eindeckung bei S-FISH-Experimenten wurde von dem erstarrten Gel mit einem Messlöffelchen ein Aliquot von ca. 50 µl abgenommen und in der Mikrowelle wieder verflüssigt.

2.4.4 Durchführung von Waschung und Detektion bei S-FISH

Die Posthybridisierungswaschungen waren beim S-FISH wesentlich vereinfacht. Es kam für alle Sonden ein adaptiertes *rapid wash*-Protokoll zum Einsatz.

Nach der Hybridisierung der Sonden auf den Zellen, welche im 500 µl Eppendorf-Gefäß ablief, wurde dieses in ein auf ca. 68°C vorgewärmtes Wasserbad gestellt und direkt auf die Hybridisierungssuspension 500 µl 68°C warme 0,4xSSC-Lösung

gegeben und für 2 min bei dieser Temperatur inkubiert. Danach wurde für 10 min mit 1500 U/min bei 4°C zentrifugiert und der entstehende Überstand verworfen. Als nächstes wurde bei Raumtemperatur 2 min mit 4xSSC/Tw gewaschen. Bei allen Waschschritten war darauf zu achten, dass die Suspension keiner direkten Lichtbestrahlung ausgesetzt war.

Nach Beendigung der Waschung mit 4xSSC/Tw, wurde bei ausschließlich direkt markierten Sonden für etwa 10 min mit 100 µl DAPI/*Antifade*-Lösung vorgefärbt, nachdem wieder zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde.

Bei Sondenmischen, welche indirekt markierte Anteile haben, wurde zunächst mit 500 µl SSCTM für 15 min bei 37°C die unspezifischen Bindungsstellen abgeblockt.

Nach der folgenden Zentrifugation konnte mit einem Mix aus 100 µl SSCTM und 3 µl Strept-Avidin-Cy 5 45 min bei 37°C detektiert werden. Daran schloss sich eine abschließende Waschung mit 4xSSC/Tw für 5 min im Schüttler und die o.g. Vorfärbung mit DAPI/*Antifade*-Lösung an. Nach den 10 min Vorfärbung wurde die DAPI enthaltende Suspension mit 400µl 0,9%-iger NaCl-Lösung verdünnt und anschließend zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde wieder verworfen. Der letzte Schritt war dann die fixierende Gegenfärbung. Dabei wurde etwa 50 µl DAPI-Agarosegel in der Mikrowelle wieder verflüssigt und dann zu der hochkonzentrierten Restzellsuspension gegeben. Solange das Gel mit den Zellen noch flüssig war, konnte es auf gekammerte Objektträger (Superfrost® Plus 3-Chamber-Slides, MJ Research®) mit einem Kammervolumen von 15 µl gegeben und mit einem Deckglas 24 x 60 mm abgedeckt werden.

2.5 Auswertung der Analysen

Die Auswertung der Analysen dieser Arbeit erfolgte an einem Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss[®]) mit einem 6-Filtersystem und motorisiertem Z-Fokus durchgeführt. Mit dem 6-Filtersystem konnten die Farbstoffe DAPI, SpectrumGreen[™], SpectrumOrange[™], TexasRed[™], DEAC und Cy5 nacheinander aufgenommen werden. Zur Bildaufnahme und Bearbeitung wurde zu Beginn der Arbeit eine Standard-CCD-Kamera (IMAC[®]) und die *Isis*[®]-Software der Firma Metasystems GmbH, Altlussheim eingesetzt. Diese Software bot für die Analysen dreidimensionaler Strukturen aber nur ungenügend Möglichkeiten. Deshalb wurden alle späteren Untersuchungen mit einer hochauflösenden 12bit-CCD-Kamera (*F-View2*[®]) und der *AnalysisD*[®]-Software von *Soft Imaging System* GmbH, Münster durchgeführt.

III. Ergebnisse

Bei der Etablierung einer neuen Methodik zur Durchführung von „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an dreidimensional erhaltenen Interphasekernen“ wurden verschiedene Ansätze getestet. Ein Teil der Ansätze basierte gedanklich auf bestehenden Methoden der Molekularen Zytogenetik. Die anderen Variationen der Methoden waren Neuentwicklungen.

3.1 Von der Routine-Chromosomenpräparation abgeleitete 3D-Methode

In der Zytogenetik und Molekularen Zytogenetik werden Metaphasenchromosomenpräparate verwendet, deren Herstellung durch Auftropfen von Lymphozytensuspension (in Fixativ) auf einen Objekträger erfolgt (siehe 2.1.2). Diese Methode kann auch zur Herstellung zweidimensionaler Zellkernpräparate angewendet werden. Es kommt bei dieser Präparationsmethode jedoch durch das Verdunsten des Methanols aus dem Fixativ und der hygroskopischen Wirkung des Eisessigs zu Quellungs- und Schrumpfungsvorgängen, die Auswirkungen auf die Grösse der Zellkerne (Claussen *et al.*, 2002) und damit auf Ihre Dreidimensionalität haben.

3.1.1 Reduktion der Luftfeuchte über Silicagel

Um die genannten Quellungeffekte zu umgehen bzw. so gering wie möglich ausfallen zu lassen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die OT's mit der Zellsuspension in einer Umgebung zu trocknen, in der die Luftfeuchtigkeit so weit als möglich reduziert ist.

Als geeigneter Stoff erwies sich Silicagel. Es hat einerseits gute hygroskopische Eigenschaften, andererseits ist es nach Verbrauch unter Wärme regenerierbar.

Das hierfür verwendete System, welches aus einer 10 cm x 20 cm großen Box zu Hälfte gefüllt mit Silicagel bestand, erbrachte hygrometrisch gemessene Luftfeuchtwerte von ca. 8 %.

Der Aufbau ist so gewählt worden, dass die Lymphozytensuspension mittels einer 2 ml Spritze (Braun®) und Kanüle (Braun® Sterican, 0,8x40) auf den in der Box gelagerten OT getropft werden konnte (Abb. 3.1. und 3.2.).



Abb. 3.1 Versuchsaufbau für die Präparation unter reduzierter Luftfeuchte



Abb. 3.2 Detaildarstellung des Versuchsaufbaus

Verwendete DNA-Sonden

Die so präparierten Objektträger wurden ausschließlich mit *Banding*-Sonden (MCB) für das Chromosom 5 gefärbt, da die Etablierung dieser Methode im 3D-Interphasekern zu Beginn der Arbeit im Vordergrund stand.

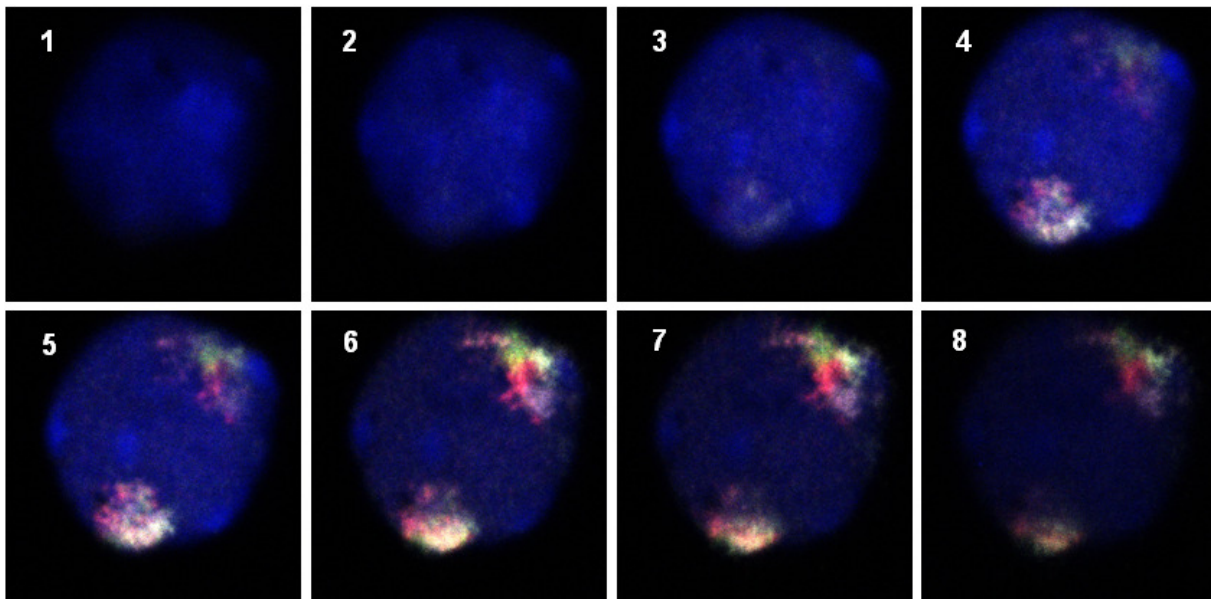


Abb. 3.3 Schnittbildfolge eines Lymphozytenzellkerns mit MCB 5 hybridisiert (aufgenommen und bearbeitet mit Zeiss[®] LSM 510 und AxioVision[®] Software, Zeiss[®] AG, Jena)

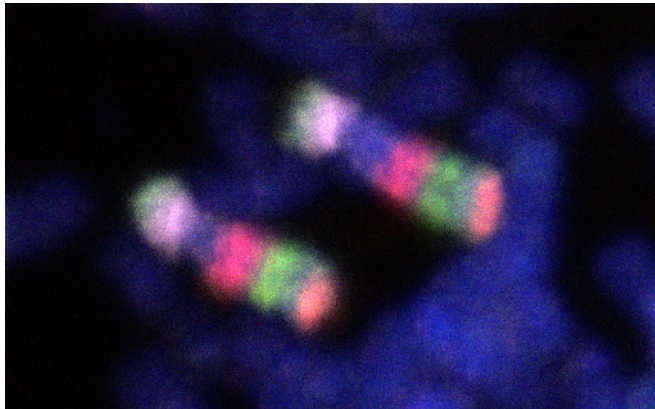


Abb. 3.4 Metaphasechromosom mit MCB #5
(aufgenommen und bearbeitet mit Zeiss[®] LSM 510 und
AxioVision[®] Software, Zeiss[®] AG, Jena)

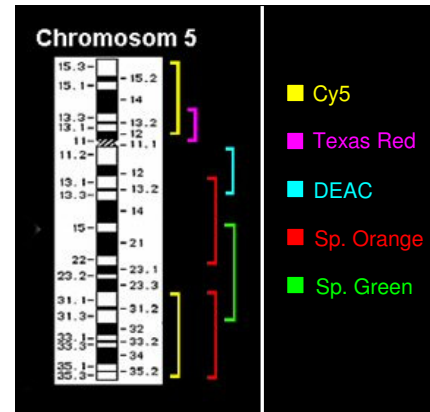


Abb. 3.5 Labelschema MCB 5

Mit dieser Methode wurden 30 Experimente durchgeführt. Bei allen gelang die Hybridisierung in der Qualität, wie sie in Abb. 3.1. erkennbar ist. Jedoch konnte in allen Experimenten lediglich eine Dreidimensionalität erreicht werden, die etwa 10 - 25% einer Vollkugel entsprach. Es war nicht möglich, diese Prozentangabe durch Messreihen zu verifizieren, da zu der Zeit keine Software zur Verfügung stand, mit welcher 3D-Rekonstruktion und 3D-Messungen durchgeführt werden konnten. Vielmehr wurde dies anhand von Parametern, welche aus der vorhandenen Software (Isis[®] FISH Imaging Software, Metasystems Altlussheim) abgeleitet werden konnten, näherungsweise ermittelt. Diese Parameter stellen die Anzahl der Einzelschnitte durch einen Kern, den Abstand zwischen den Einzelschnitten und, als einzigen Messwert, den Durchmesser des Kernes dar, welcher anhand des zweidimensionalen Bildes ermittelt wurde. Hieraus ergab sich ein Wert für die Z-Ausdehnung des Kernes.

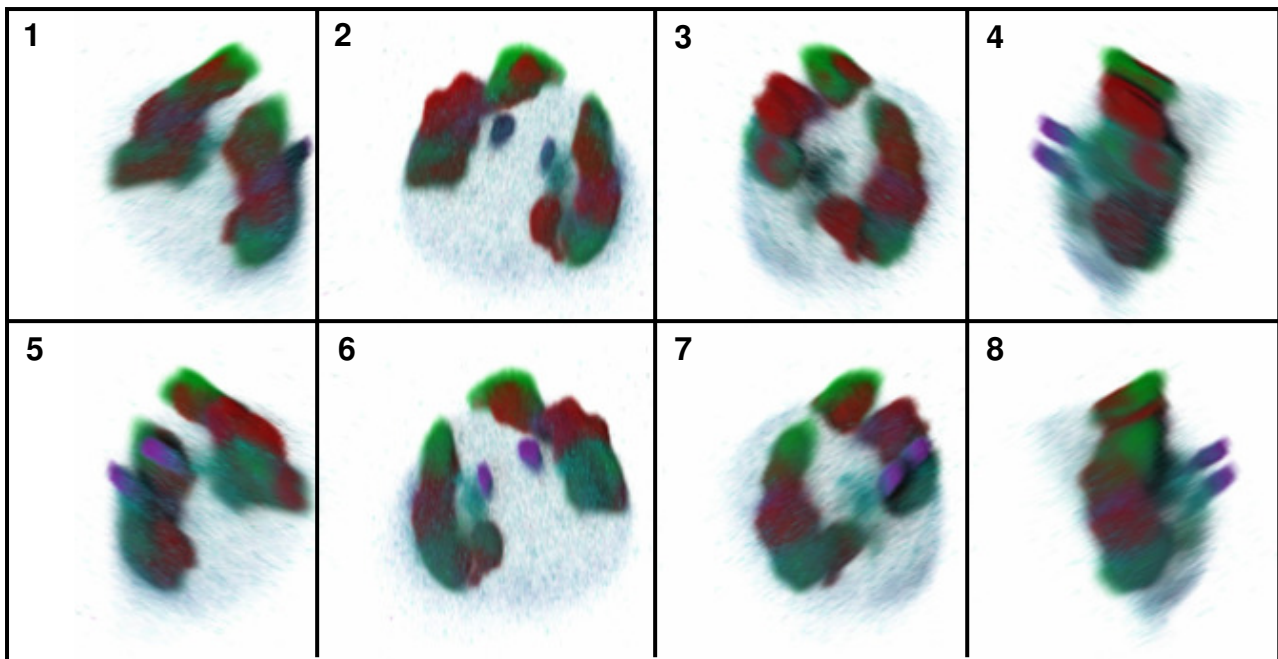


Abb. 3.6 Projektion eines Blutlymphozyten, gefärbt mit MCB 5 (einzige existierende Bildserie, zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. V. Beensen, Inst. f. Humangenetik und Anthropologie) (aufgenommen und bearbeitet mit Zeiss® LSM 510 und AxioVision® Software, Zeiss® AG, Jena)

3.1.2 Präparation unter absoluten Trockenbedingungen

Da die alleinige Verwendung von Silicagel nachweisbar nicht ausreichte, um die Trocknung der Lymphozytenpräparate so zu beeinflussen, dass ihre dreidimensionale Struktur erhalten bleibt, war das Ziel die Schaffung eines geeigneten Umgebungsmilieu.

Zu diesem Zweck wurde ein halboffenes System konstruiert, welches Wärmeapplikation und Trockenbedingungen von 0% Luftfeuchte kombiniert.

Da ein solches System per se nicht zur Verfügung stand, wurde als Basis auf vorhandene Laborgeräte und Medizinprodukte aus dem Klinikbedarf zurückgegriffen.

Basis des Aufbaus ist eine SpeedVac-Zentrifuge. Diese besitzt einerseits eine Vakuum-Absaugung und andererseits ein Heizelement zur optimalen und schnellen Trocknung.

Für die Anwendung dieses Gerätes, waren einige einfache aber wesentliche konstruktive Veränderungen nötig. Zum einen wurde der Zentrifugenteller entfernt und an seine Stelle ein schalenförmiges Behältnis aus PVC eingebracht, welches mit Silicagel befüllt war (Abb. 3.6.). Der zu betreffende Objektträger wurde auf einem Gestell über dem Silicagel positioniert (Abb. 3.7.). Die Kombination aus Vortrocknung mittels Silicagel und anschließender Vakuumabsaugung erbrachte die geforderte Luftfeuchtigkeit von 0%.

Um die Zellsuspension auf den Objektträger aufbringen zu können, ohne das zuvor hergestellte Milieu zu stören, musste ein neuer Zentrifugendeckel mit Schleusenfunktion

konstruiert werden. Hierzu fand Plexiglas mit den Grundabmessungen des Originalzentrifugendeckels Verwendung. Mittig wurde ein Loch von etwa 2 cm Durchmesser geschaffen, welches mit einem durchstechfähigen Labor-Gummistopfen wieder verschlossen wurde (Abb. 3.6.). Als Schleuse bzw. Applikator durch diesen Stopfen fand eine Venenverweilkanüle (Vasofix[®] Braunüle[®], rosa, 0,76mm x 33mm, Fa. Braun[®]), kombiniert mit einem Dreiwegehahn (Discofix[®] C, blau, Fa. Braun[®]) Verwendung. Der Dreiwegehahn wurde auf die Braunüle aufgeschraubt, nachdem sie durch den Gummistopfen gestochen und der Stahlmandrin entfernt wurde. Zum Applizieren der Zellsuspension durch diese Schleuse konnte eine Spritze (Einmalspritze, Fa. Braun[®], Injekt[®], 2 ml) aufgesteckt werden (Abb. 3.5.). Die Tropfgeschwindigkeit ließ sich durch Veränderung des Flussquerschnittes am Dreiwegehahn regulieren. Während des Tropfvorganges und der anschließenden Trocknung musste die Vakuumabsaugung weiter betrieben werden, da sich das Zielmilieu anderenfalls nicht aufrechterhalten ließ. Die weitere Aufarbeitung der Zellkernpräparate erfolgte nach dem standardisierten FISH-Protokoll (siehe 2.2. und 2.4.).

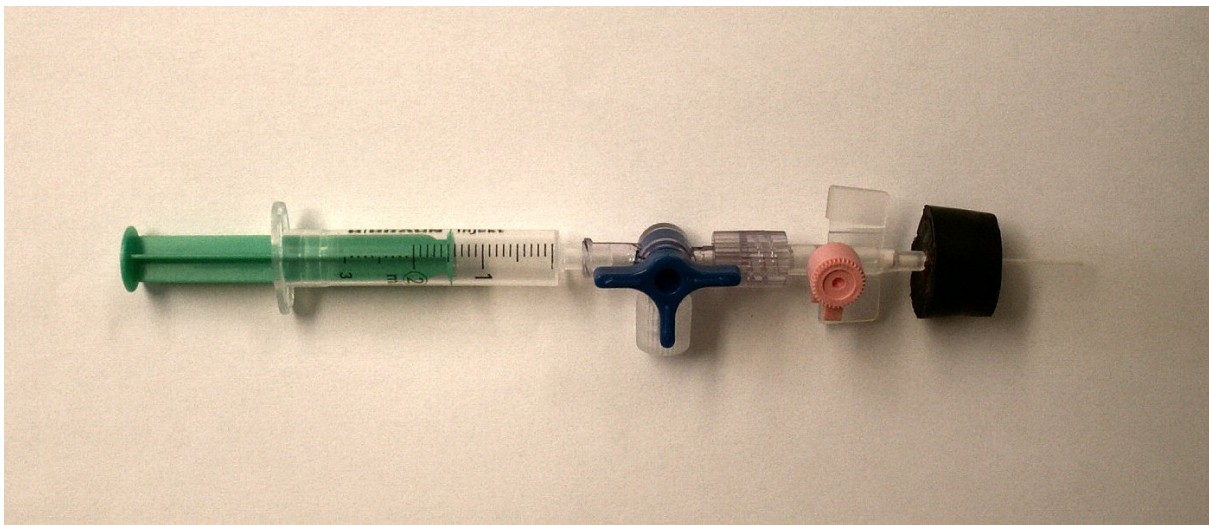


Abb. 3.7 Applikator zum Aufbringen der Zellsuspension



Abb. 3.8 Applikations- und Trocknungssystem

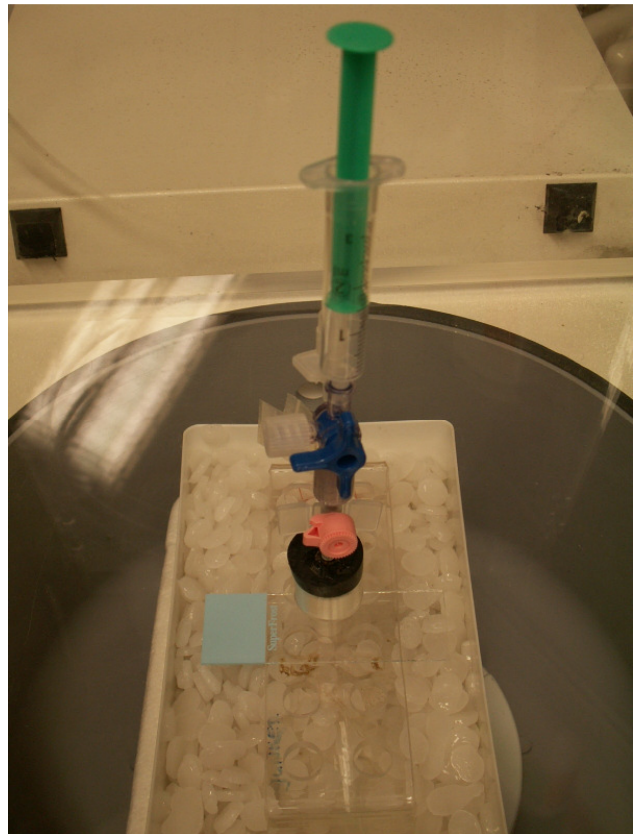


Abb. 3.9 Blick in die Trocknungskammer

Mit dieser Methode wurden 20 Experimente durchgeführt. Bei allen zeigte sich jedoch, dass die Anlage des Vakuums zu einer Zerstörung der Kernmembran führte und dadurch die dreidimensionale Struktur nicht erhalten werden konnte. Die Kerndestruktion hatte zur Folge, dass keine erfolgreichen Hybridisierungsergebnisse vorliegen.

3.1.3 Verwendete DNA-Sonden

Bei der Anwendung dieses Verfahrens wurden ebenfalls nur *Banding*-Sonden (MCB) für das Chromosom 5 verwendet.

3.2 Schichtmethode für solide Gewebe (ML-FISH)

Aus der Zusammenarbeit mit Prof. Jirikowski vom Institut für Anatomie der FSU Jena resultierte die Entwicklung eines Verfahrens zur dreidimensionalen Analyse, welches sich auf die Untersuchung solider Gewebe stützt. Hierfür sind theoretisch alle Gewebetypen verwendbar. Während der Entwicklung wurden jedoch ausschließlich Lymphknotenpräparate verwendet. Diese Methode wurde ML-FISH (*multi layer* –FISH) genannt. Die Technik der ML-FISH ist detailliert unter 2.1.3. und 2.2.2. beschrieben.

3.2.1 Durchführung der Schichtmethode

Die verwendeten Lymphknotenpräparate wurden im Institut für Anatomie der FSU Jena in einem Kunstharz auf Basis Akrylamid eingegossen. Chemisch handelt es sich bei dieser Einbettung um künstlichen Bernstein. Anschließend erfolgte die Anfertigung von Schnitten mittels Ultramikrotom (Ultracut[®], Fa. Reichert[®]), welche dann auf einen Objektträger aufgebracht werden konnten. Die Dicke der Schnitte wurde zwischen 0,1 und 1,0 µm gewählt.

Nach dem Trocknen der Schnitte auf dem Objektträger, erwies sich die Entfernung des Kunstharzes als notwendig, damit die DNA-Sonden entsprechend an die Ziel-DNA in den Zellkernen binden konnten. Dieser Schritt wurde mit Natriummethylat-Lösung durchgeführt. Alle vorbereitenden Maßnahmen vor Hybridisierung der DNA-Sonden auf die Gewebeschnitte wurden am Institut für Anatomie der FSU Jena durchgeführt.

Im Anschluss an die Entfernung des Kunstharzes konnten die DNA-Sonden direkt auf die Präparate gegeben werden. Die, bei der Routinechromosomenpräparation nötigen Schritte des Pepsinverdaus und der Denaturierung sind bei dieser Methode nicht notwendig.

Dies hat zwei Ursachen. Zum einen muss die Ziel-DNA nicht von umgebenden Plasmaresten befreit werden, um sie für die Sonden-DNA zugänglich zu machen, da sie durch die Semidünnschnitttechnik an sich gut erreichbar ist. Zum anderen wirken Bestandteile des Kunstharzes selbst denaturierend. Dieser Bestandteil ist Propylenoxid, welcher als Einzelstoff im Rahmen dieser Arbeit auch als neues Denaturierungsreagens getestet wurde. Aufgrund seiner stofflichen Eigenschaften (Siedepunkt bei Raumtemperatur, Karzinogenität) erwies es sich jedoch für die Routineanwendung als ungeeignet.

Die Hybridisierung der Sonden erfolgte nach dem Standard FISH-Protokoll (siehe 2.2 und 2.4).

3.2.2 Verwendete DNA-Sonden

Bei der Etablierung des ML-FISH fanden verschiedene Sonden Anwendung. Anfänglich waren dies MCB-Sonden für das Chromosom 5, im Weiteren auch Ganz- und Teilchromosomensonden (*wcp*- und *pcp*-Sonden) für das Chromosom 17. Die Auswahl für die *wcp*- und *pcp*-Sonden geschah willkürlich ohne inhaltliche Vorgaben.

Im Folgenden sind jedoch ausschließlich Bilder von Hybridisierungen mit MCB 5 gezeigt, da Versuche mit den anderen Sonden keine ausreichend befriedigenden Ergebnisse brachten.

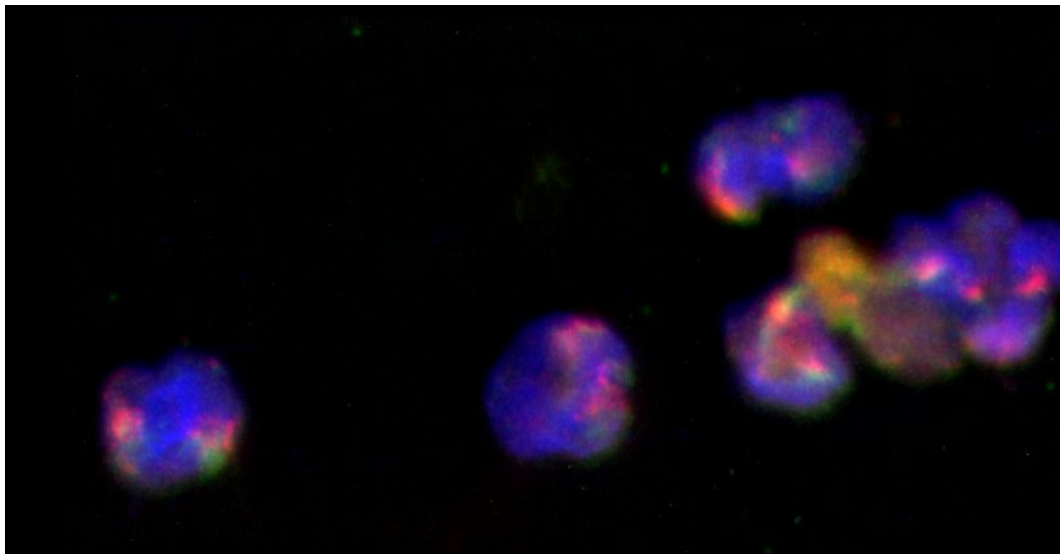


Abb. 3.10 Schnitt durch einen Nodus lymphaticus, Schichtdicke 0,5 μm , MCB 5
(aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit Isis[®] FISH Imaging Software, Fa. Metasystems[®], Altussheim)

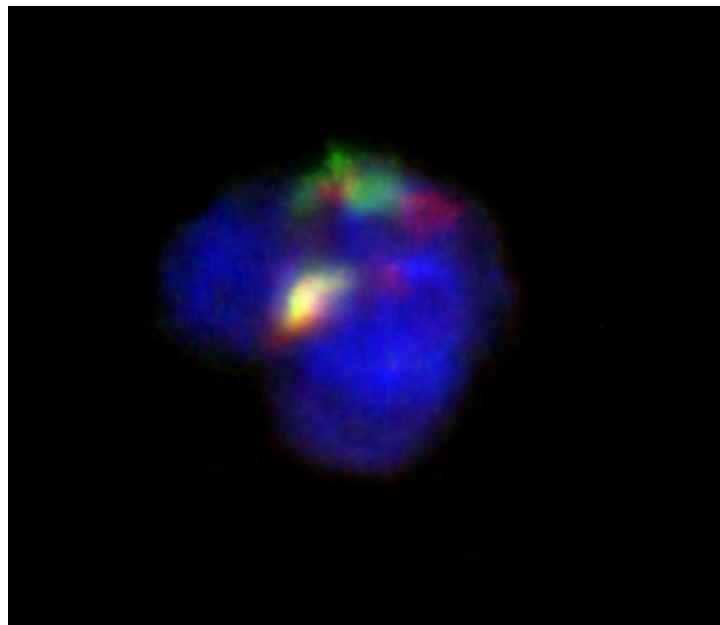


Abb. 3.11 Einzelne Lymphknotenzelle, gefärbt mit MCB 5
(aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit Isis[®] FISH Imaging Software, Fa. Metasystems[®], Altussheim)

Mit dem Ansatz des ML-FISH wurden 20 Experimente durchgeführt. Bei den erfolgreichen Hybridierungen konnte eine Hybridisierungsqualität erreicht werden, wie sie in Abb. 3.10. und 3.11. erkennbar ist.

3.3 Direkte Suspensions-Hybridisierung (S-FISH)

Aus der Erkenntnis, dass die Ergebnisse der bisher genannten Methoden nicht in der Weise reproduzierbar bzw. mit vertretbarem Aufwand nicht zu realisieren waren, wie es für die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen nötig ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein völlig neues 3D-Präparations- und Hybridisierungsverfahren entwickelt. Da dieses nicht auf bisher praktizierten Verfahren basiert, konnten bei der Entwicklung verschiedene Ansprüche berücksichtigt werden. So sollte das neue Verfahren für die meisten Zellmaterialien in der Routine der molekularen Zytogenetik nutzbar sein. Die Anwendung eines breit nutzbaren Spektrums an DNA-Sonden und die Erhaltung eines möglichst naturnahen Zustandes der Zellkerne waren weitere Ansprüche.

Da die Präparation unter Trocknungsbedingungen nicht in der gewünschten Weise funktionierte, entstand die Überlegung, dass sich mit einer gegenteiligen Methode entsprechende Vorgaben eventuell erfüllen lassen.

3.3.1 Methode des *Suspension*-FISH-Verfahrens (S-FISH) (modifiziert nach Steinhäuser *et al.*, 2002)

Das *Suspension*-FISH basiert auf der Verwendung von Zellsuspensionen, wie sie in der Routinediagnostik der Zytogenetik und molekularen Zytogenetik bearbeitet werden. Diese sind in einem Gemisch aus einem Teil Eisessig und zwei Teilen Methanol fixiert. Die Methode ist detailliert im Teil „Material und Methoden“ beschrieben.

Um die schon beschriebenen Quellungsvorgänge zu verhindern und die Zellkerne in einer naturnahen Größe stabil zu halten, müssen diese schrittweise von Fixativ befreit und dann rehydriert werden.

Die Entfernung des Fixativs wird mit einer Methanol-Waschung erreicht. Die Rehydrierung und Stabilisierung des Grössenzustandes erfolgt mit isotoner (0,9%iger) Natriumchloridlösung. Die Expositionszeit muss dabei sehr genau eingehalten werden, da die Zellkerne bei zu langer Einwirkzeit geschädigt werden.

In Anlehnung an das Protokoll der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung sind auch die Zellkerne in Suspension von Plasmaresten mittels Pepsinverdau zu befreien, um die Ziel-DNA für die DNA-Sonden besser zugänglich zu machen. Ein sich anschließender

Denaturierungsschritt bewirkt, dass der DNA-Doppelstrang der Kern-DNA einzelsträngig vorliegt. Dies ist die Grundlage für die Anlagerung der DNA-Sonde.

Die Zeit des eigentlichen Hybridisierungsschrittes betrug je nach Sonde etwa 24 bis 48 Stunden. Überschüssiges Sondenmaterial wurde dann in speziellen Waschschritten vom Untersuchungsmaterial entfernt.

Abschließend erfolgte sowohl eine Gegenfärbung mit DAPI, um die Zellkerne sichtbar zu machen als auch eine Fixierung in einem Medium, welche bewirkt, dass sich die Zellkerne bei der Analyse am Mikroskop nicht auf dem OT bewegen (siehe 2.4.1.1.).

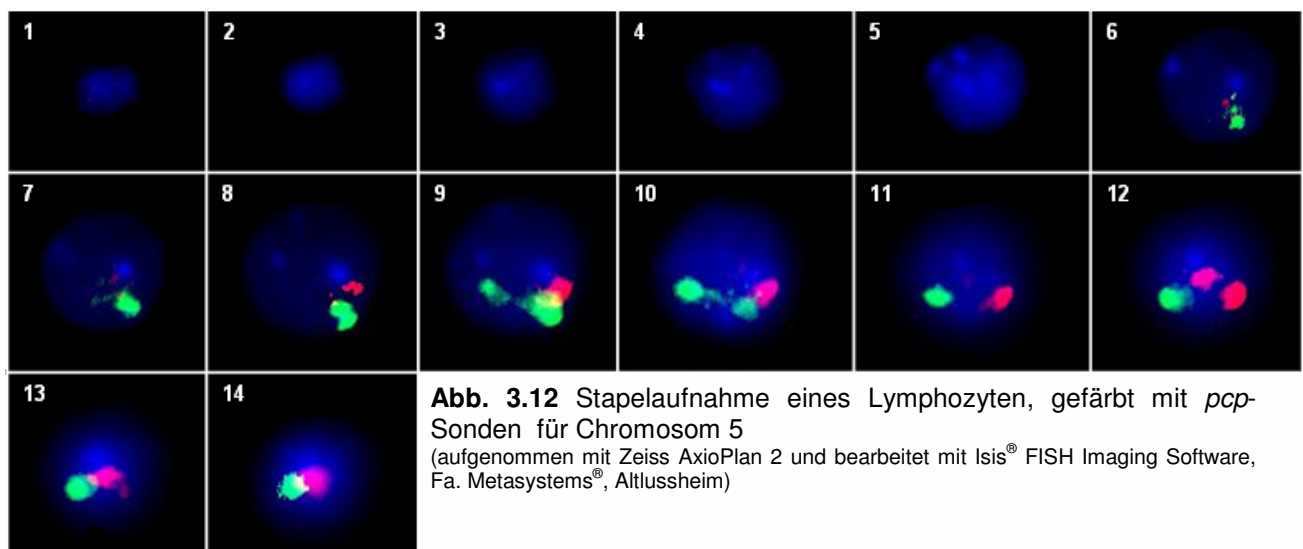
Die Durchführung der dreidimensionalen Rekonstruktion der einzelnen Bilder erfolgte mit Computersoftware. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anfänglich die AxioVision Software des LSM 510 Meta Mikroskops der Fa. Zeiss und später die AnalysisD[®]-Software von Soft Imaging System GmbH verwendet. Insgesamt beinhalteten die Untersuchungen über 50 Experimente mit unterschiedlichen Sonden.

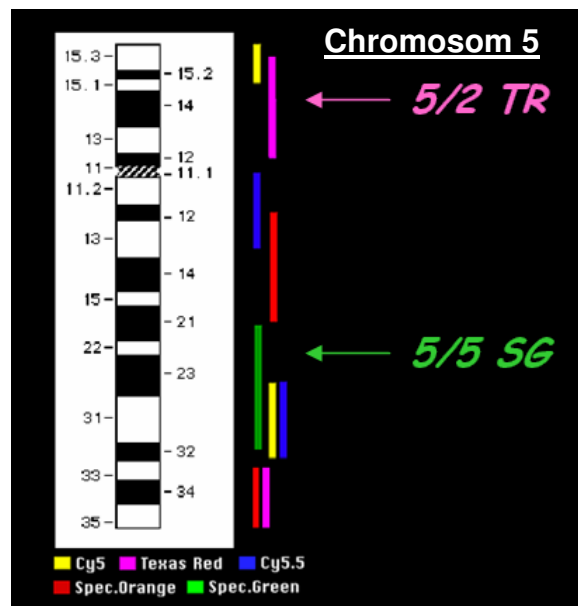
3.3.2 Verwendete DNA-Sonden

Bei der Erprobung dieses neu entwickelten Ansatzes kamen eine Reihe unterschiedlicher DNA-Sonden für verschiedene chromosomale Bereiche zum Einsatz. Dies waren sowohl Ganz- und Teilchromosomensonden, Zentromersonden als auch FISH-Bänderungstechniken.

3.3.2.1 Verwendete Teilchromosomensonden (*pcp*-Sonden)

Die ersten Experimente mit der S-FISH-Methode wurden mit Teilchromosomensonden (*pcp*-Sonden) durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit dieser zu den Experimenten vom Beginn der Arbeit zu gewährleisten, wurde dabei auf einzelne Banken des MCB 5 zurückgegriffen.



Abb. 3.13 Lokalisation der verwendeten *pcg*-Sonden

3.3.2.2 Verwendete Ganzchromosomensonden (*wcp*-Sonden)

In der Routine der Molekularen Zytogenetik werden auch *wcp*-Sonden in Diagnostik und Forschung eingesetzt. Auch mit diesen Sonden wurden einige Experimente durchgeführt. Dabei erfolgte exemplarisch die Verwendung der *wcp*-Sonde für das Chromosom 4.

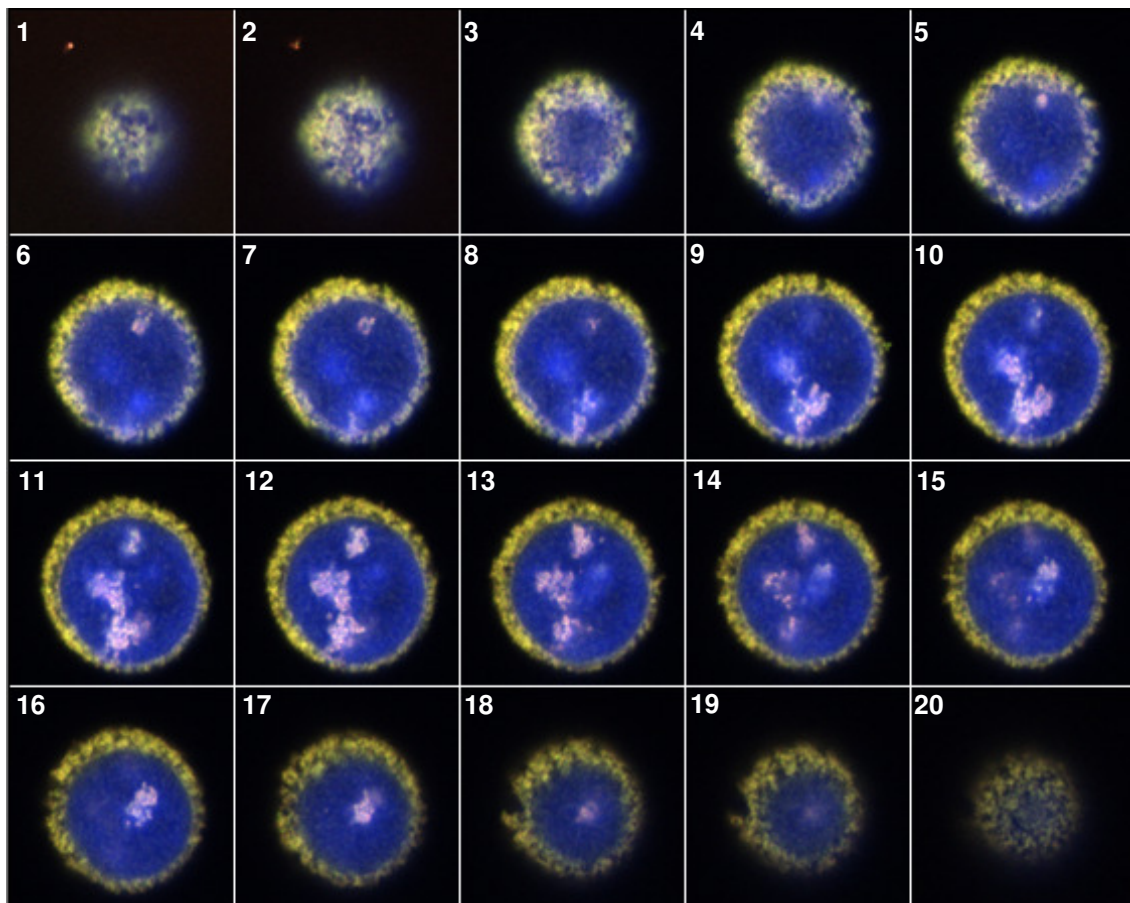


Abb. 3.14 Stapelaufnahme eines Lymphozyten, gefärbt mit *wcp*-Sonde (Spectrum Orange) für Chromosom 4 (aufgenommen und bearbeitet mit Zeiss® LSM 510 und AxioVision® Software, Zeiss® AG, Jena)

3.3.2.3 Zentromersonden

Im Rahmen der Etablierung des S-FISH-Verfahrens wurden verschiedene Zentromersonden getestet. Als Einzelsonden kamen exemplarisch Sonden für die Zentromere der Chromosomen 6, 16 und 18 zum Einsatz. Großes Interesse bestand an der Etablierung des cenM-Sonden-Mixes, bei dem die Zentromere aller Chromosomen in unterschiedlichen Farbkombinationen angefärbt werden.

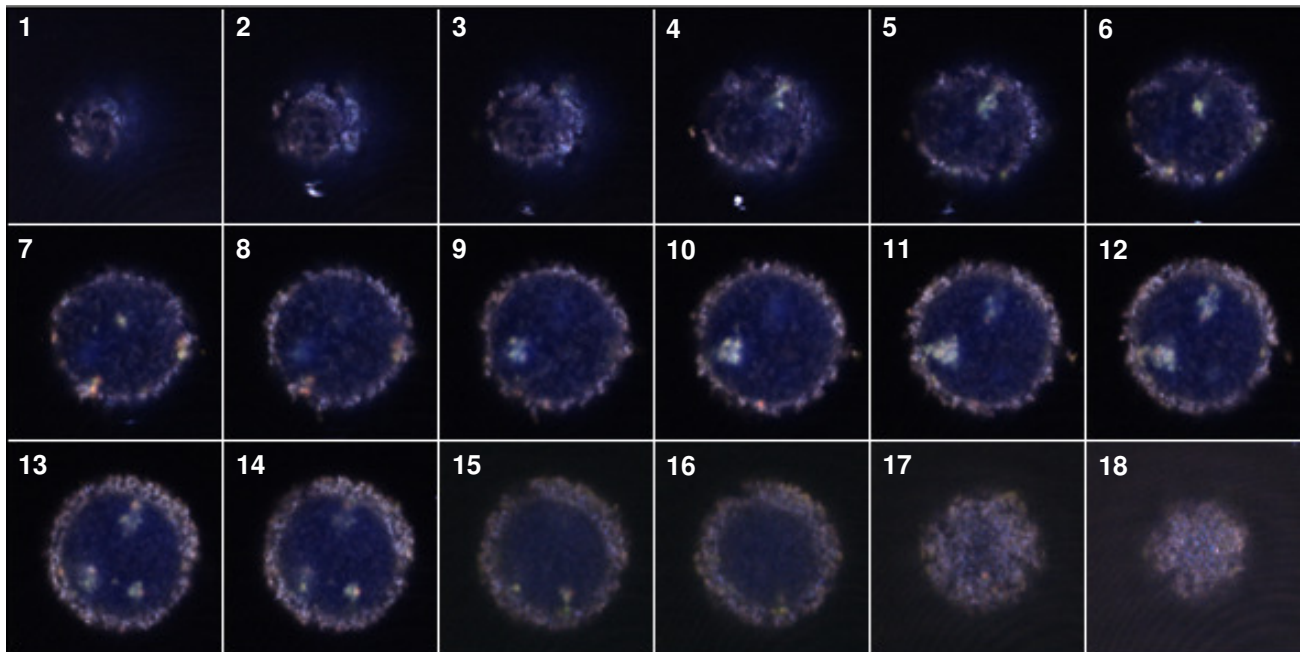


Abb. 3.15 Stapelaufnahme eines Lymphozyten, gefärbt mit cenM-Mix
(aufgenommen und bearbeitet mit Zeiss[®] LSM 510 und AxioVision[®] Software, Zeiss[®] AG, Jena)

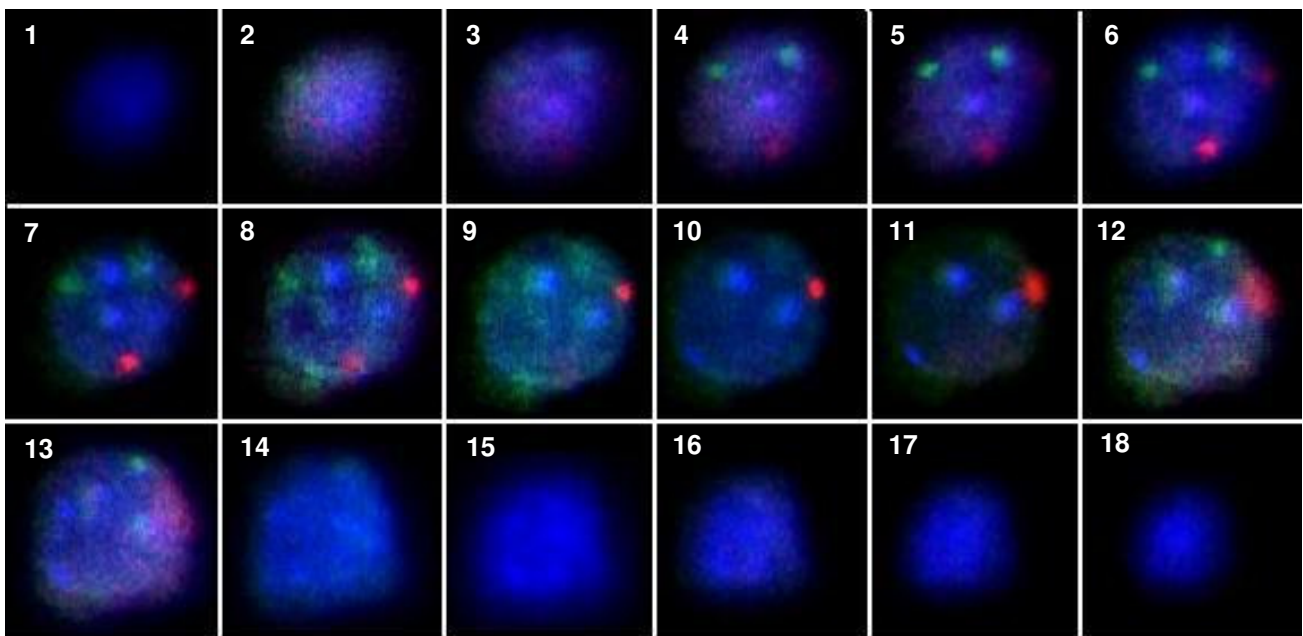


Abb. 3.16 Stapelaufnahme eines Lymphozyten, gefärbt mit Zentromer 6 (Spectrum Green),
Zentromer 16 (Spectrum Orange) und Zentromer 18 (Spectrum Aqua)
(aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit Isis[®] FISH Imaging Software, Fa. Metasystems[®], Altlussheim)

3.3.2.4 FISH-Bänderungstechniken (MCB)

Eine weitere Sondenkategorie, an welcher ein besonderes Interesse bestand, sie für die 3D-Interphaseanalyse zu etablieren, war das *multicolor banding* (MCB). Anfänglich wurden die Sondenkombinationen für das Chromosom 5 verwendet, um die Vergleichbarkeit zu der Arbeit von Lemke et al., 2002 zu gewährleisten. Im späteren Verlauf kam hauptsächlich die Sondenkombination für das X-Chromosom zum Einsatz.

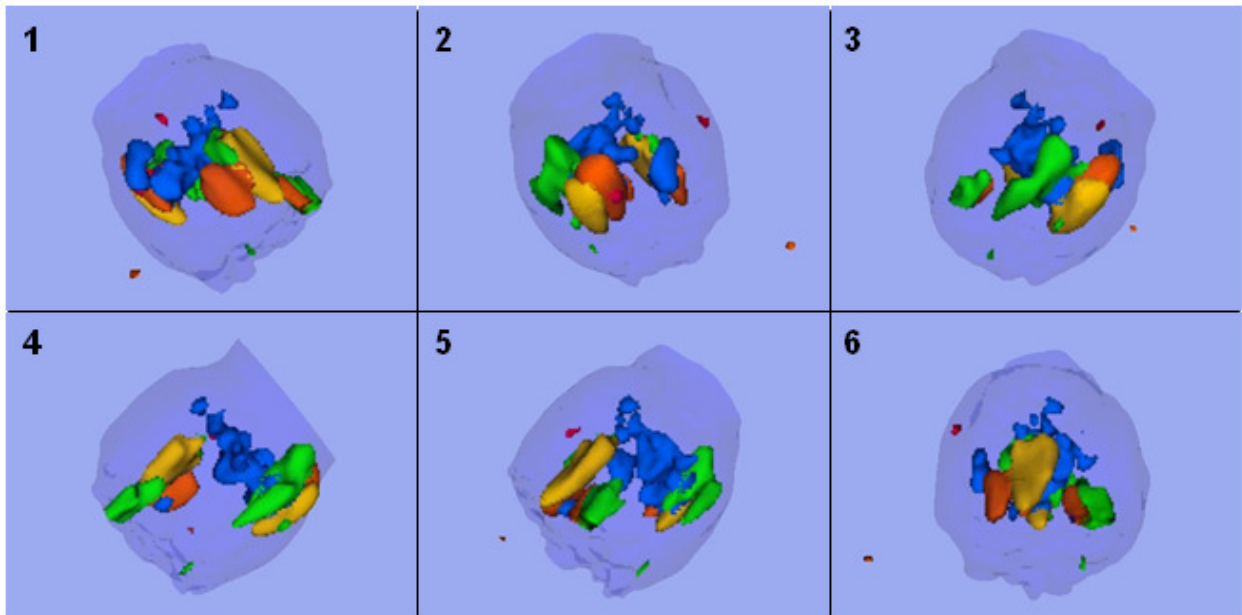


Abb. 3.17 3D-Projektion eines Blutlymphozyten, gefärbt mit MCB X
(aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit AnalysisD, Fa. Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster)

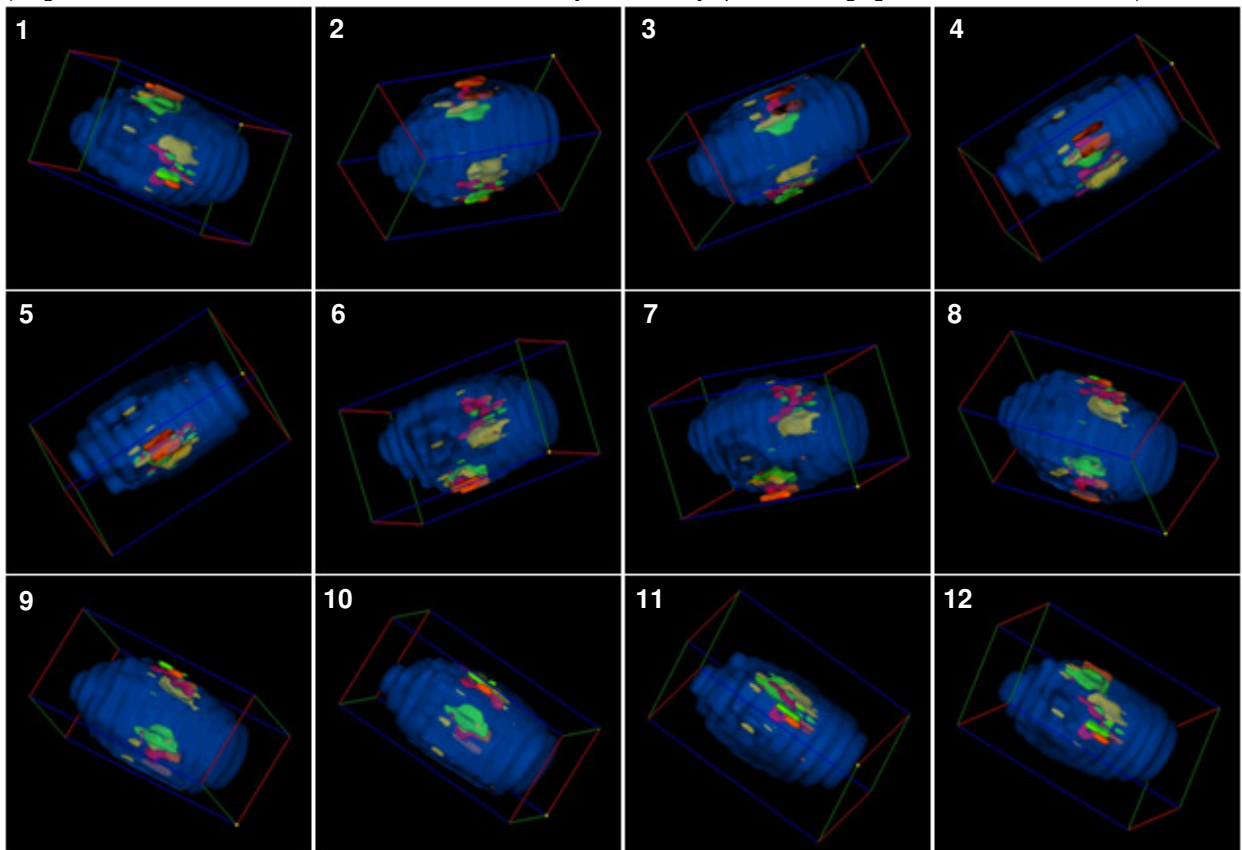


Abb. 3.18 3D-Projektion eines Blutlymphozyten, gefärbt mit MCB X (Bearb. Fr. cand. med. F. Hunstig)
(aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit AnalysisD, Fa. Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster)

3.3.3 Besondere Anwendungsmöglichkeiten

Neben den bereits genannten Anwendungen auf Zellkernen von Blutlymphozyten eröffnet das *suspension*-FISH-Verfahren auch die Möglichkeit, Untersuchungen an anderen Untersuchungsmaterialien sowie an Zellen anderer Stadien des Zellzykluses durchzuführen.

3.3.3.1 Analyse von Amniozentese-Material

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Versuche an Amniozentese-Material durchgeführt. Die Aufarbeitung dieses Materials wurde im Fachbereich „Zytogenetik“ des Instituts für Humangenetik und Anthropologie (Leitung: Fr. Dr. rer. nat. A. Weise) vorgenommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Bei Analysen an diesem Material kamen ausschließlich kommerzielle Zentromersonden für die Chromosomen X, Y und 18 (*AneuVision*, Vysis®) zum Einsatz.

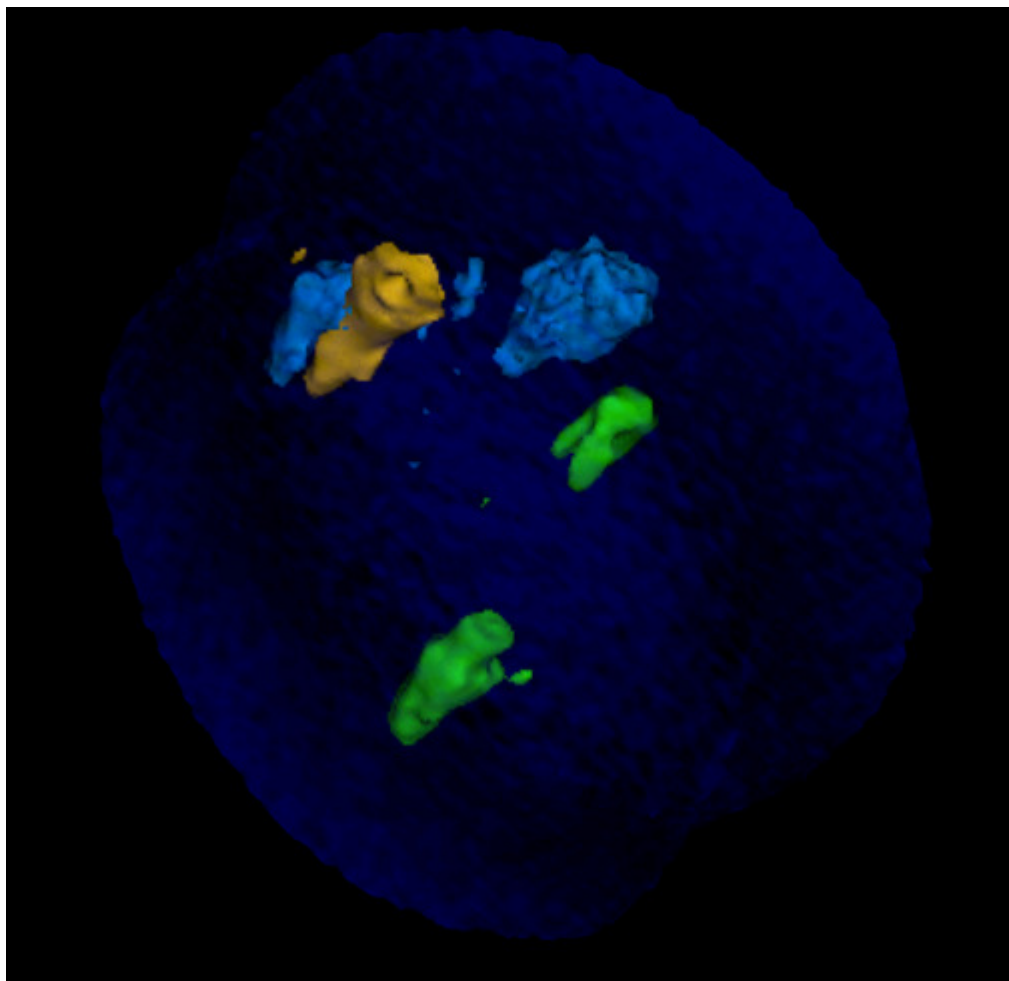


Abb. 3.19 3D-Projektion eines Amniozyten, gefärbt mit *AneuVision* Vysis® (aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit AnalysisD, Fa. Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster)

3.3.3.2 Analysen an menschlichen Spermien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine Analysen an Spermien durchgeführt. Ideen hierzu bestanden zwar schon, sollten aus technischen Gründen jedoch erst in einer Nachfolgepromotion zur Bearbeitung kommen. Die vorliegenden Bilder stellte freundlicherweise Frau cand. med. F. Hunstig zur Verfügung.

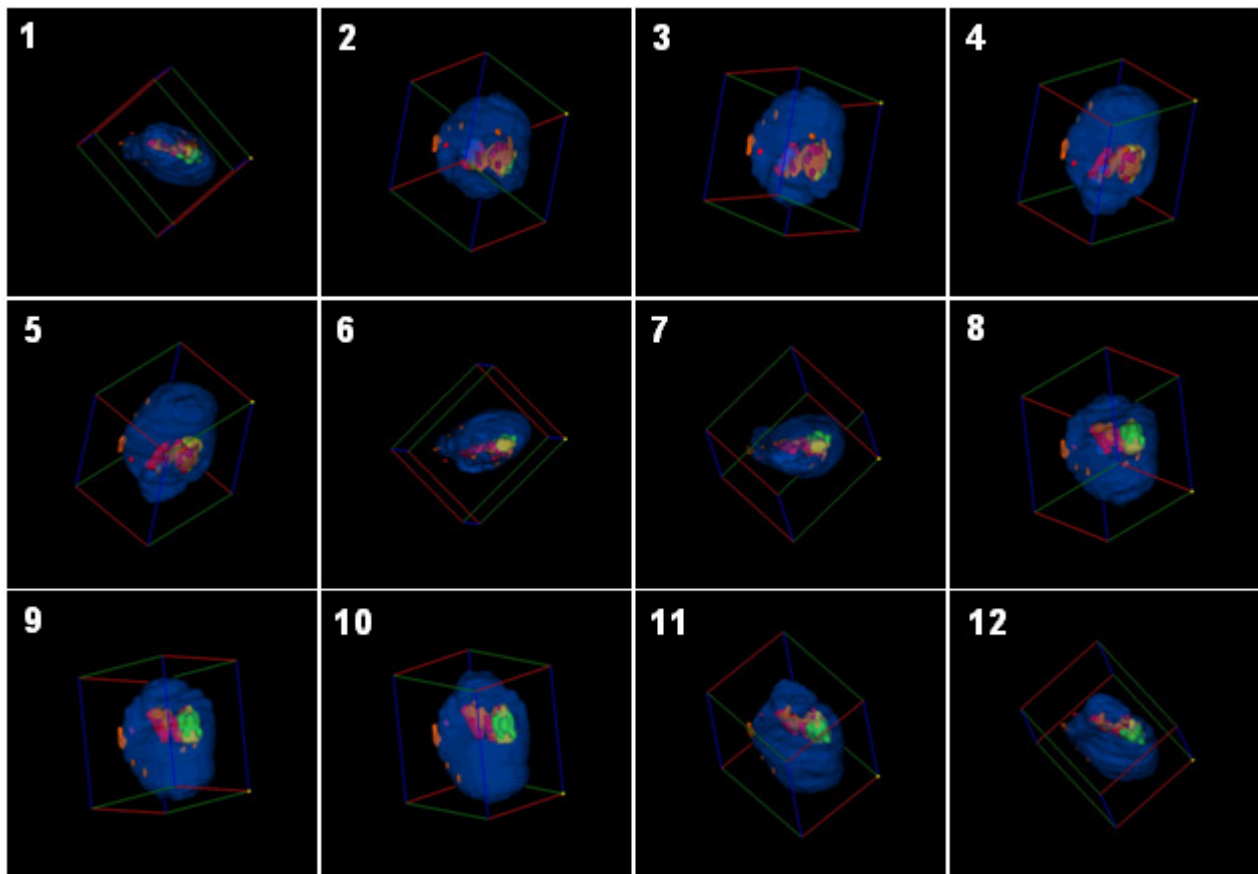


Abb. 3.20 3D-Projektion eines menschlichen Spermiums gefärbt mit MCB X (Material zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. F. Pellestor, Institute of Human Genetics, Université der Montpellier; Frankreich; Bilder zur Verfügung gestellt von cand. med. F. Hunstig, Inst. f. Humangenetik und Anthropologie, Jena) (aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit AnalysisD, Fa. Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster)

3.3.3.3 3D-Analysen im Stadium der Metaphase

Mit dem S-FISH-Verfahren konnten erstmals Metaphaseplatten dreidimensional präpariert und nach der Färbung fixiert werden.

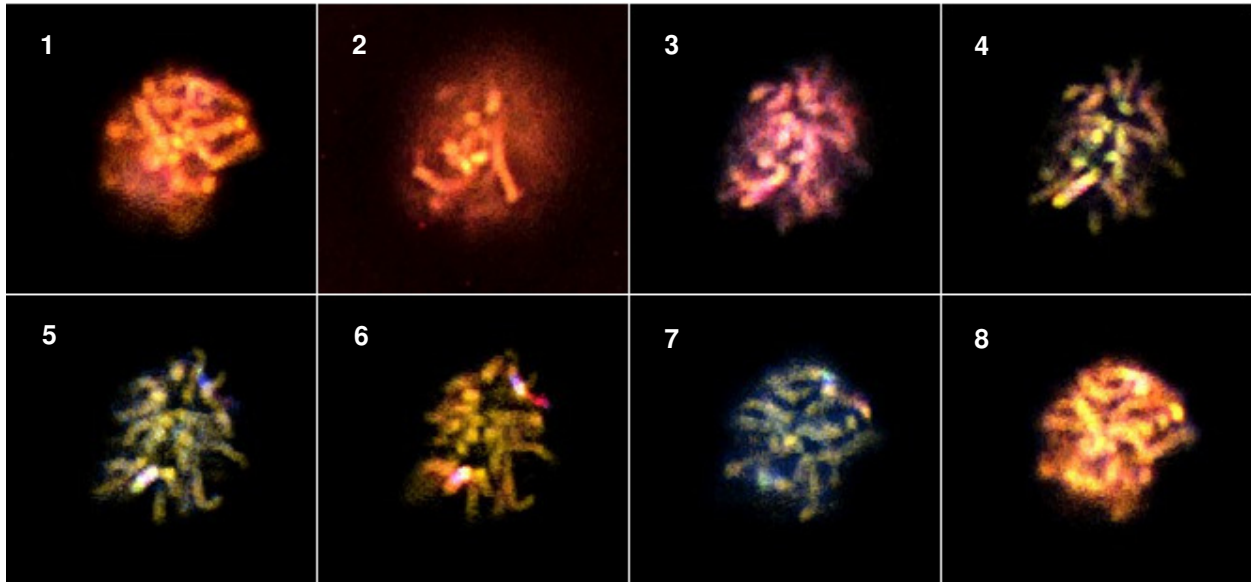


Abb. 3.21 Stapelaufnahme durch eine dreidimensional präparierte Metaphase, gefärbt mit MCB X (aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit AnalysisD, Fa. Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster)

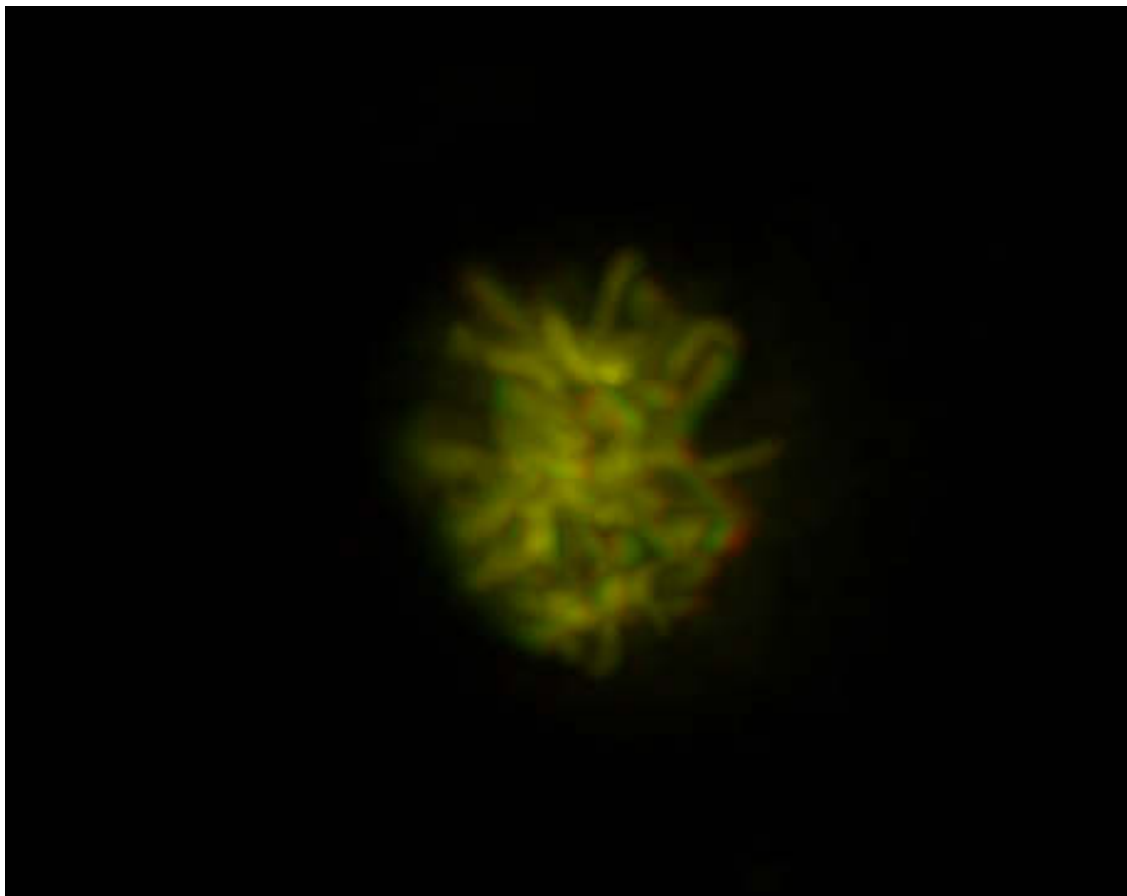


Abb. 3.22 3D-Metaphase, bearbeitet zur Ansicht mit 3D-Brille (aufgenommen mit Zeiss AxioPlan 2 und bearbeitet mit AnalysisD, Fa. Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster)

3.3.4 Erreichen nativer Kerngrößen

Mit der Präparation bzw. dem Ablauf des S-FISH-Protokolls können Kerne erhalten werden, welche in ihren Größen den nativen Verhältnissen in vivo entsprechen. So haben Lymphozyten Kerne von etwa 5 – 10 μm Durchmesser. Zellkerne, welche in Fixativ (Methanol und Eisessig) gelagert auf einen OT aufgetropft werden, können durch Quellungsprozesse mehr als doppelt so groß werden. Anhand von Messungen, welche nach den wesentlichen Schritten des S-FISH-Protokolls an, mit Giemsa gefärbten Lymphozytenkernen durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der FISH-Analysen wieder native Größenverhältnisse vorliegen.

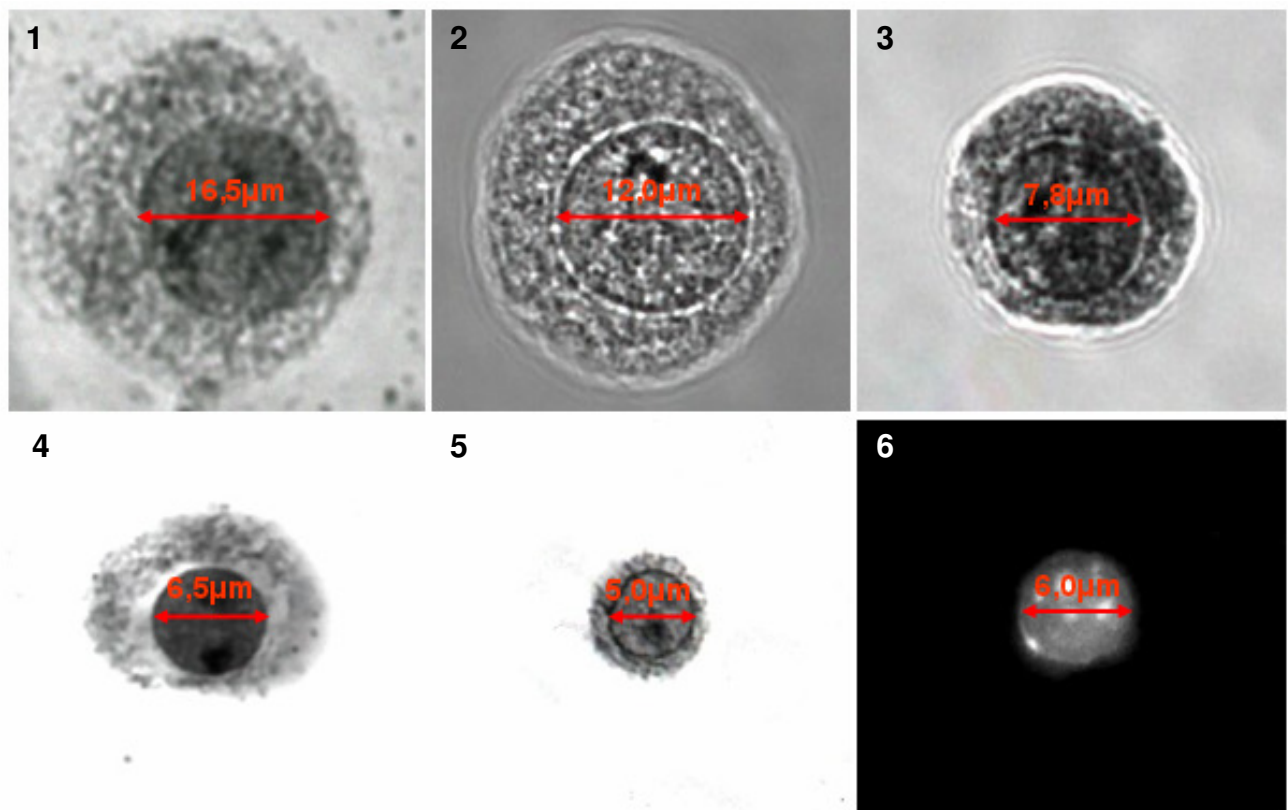


Abb. 3.23 Veränderung des Kerndurchmessers während des S-FISH

1. Lagerung und Auftropfung in Fixativ (Methanol:Eisessig = 3:1)
2. Methanolwaschung
3. Waschung mit isotoner NaCl-Lösung
4. Nach dem Pepsinverdau
5. Nach Denaturierung in isotoner NaCl-Lösung
6. Nach 24h Hybridisierung (DAPI, invertiert)

3.4 Software zur 3D-Rekonstruktion

Um die gezeigten FISH-Analysen durchführen und aufgezeichnete Stapelaufnahmen in dreidimensionale Projektionen umrechnen zu können, war es ein Ziel der Arbeit, nach Anbietern für entsprechende Computersoftware bzw. Auswertestationen zu suchen und vorliegende Software dann auf Ihre Zweckdienlichkeit zu testen. So wurden verschiedene Anbieter gefunden. Zu Beginn der Arbeit wurde die Isis[®] FISH Imaging Software der Firma Metasystems[®], Altlussheim verwendet. Diese stand im Institut für Humangenetik und Anthropologie zur Verfügung und fand in Kombination mit dem Zeiss[®] AxioPlan 2 Mikroskop Verwendung. Darüber hinaus bestand zu Beginn der Arbeit die Möglichkeit Analysen an einem Zeiss LSM 510 Meta durchzuführen, welches in den Gebäuden der Zeiss AG Jena stand. Die Untersuchungen unterstützte freundlicherweise Dr. P. Ullmann (ehem. Mitarbeiter Zeiss GmbH).

Im weiteren Verlauf wurden zur Verbesserung der Analysen und Berechnungsmöglichkeiten an den Auswertstationen des Institutes für Humangenetik und Anthropologie verschiedene 3D-Softwares getestet, welche zum freien *download* im Internet zur Verfügung stehen und mittels Lizenzerwerb für dauerhafte Nutzung zugänglich gemacht werden können. Dies war zum einen die *AmiraTM Software* der Mercury Computer Systems, Inc. (Boston, Massachusetts, USA). In diese, eigentlich für die dreidimensionale Rekonstruktion von Schnittbilduntersuchungen (CT, MRT) entwickelte Software, können auch Einzelbilder aus mikroskopischen Stapelaufnahmen eingefügt und anschließend rekonstruiert werden. Für den gleichen Zweck entwickelt und auf dem gleichen Arbeitsprinzip basierend, wurden Tests mit *VolView* der Firma *Kitware, Inc.* (New York, USA) durchgeführt.

Zum Ende der Arbeit wurde nach verschiedenen Tests und Produktpräsentationen vom Institut für Humangenetik und Anthropologie die AnalysisD[®] Software der Firma Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Münster, Deutschland) erworben. Diese konnte mit einem Interface Modul mit den Zeiss Mikroskopen verknüpft werden, wodurch verschiedene Funktionen automatisiert durchgeführt werden konnten.

IV. Diskussion

Zur Etablierung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung im dreidimensional erhaltenen Interphasekern wurde eine Reihe von gedanklichen Ansätzen getestet und auf ihre Praktikabilität hin überprüft. Dabei waren zunächst bestehende Verfahren von Interesse, die sich von Methoden der molekularzytogenetischen Routinediagnostik ableiteten. Im weiteren Verlauf der Arbeit die Entwicklung zusätzlicher Verfahren. Die Notwendigkeit dafür resultierte aus Problemen, welche sich bei den bestehenden Methoden und weiterentwickelter Varianten dieser herausstellten.

4.1 Von der Routinezytogenetik abgeleitete 3D-Methoden

4.1.1 Reduktion der Luftfeuchte über Silicagel

Zu Beginn der Arbeit bestand eine Methode zur 3D-Präparation, welche sich von der Routine-Chromosomenpräparation in der Zytogenetik ableitete und von Lemke (2002) bereits in einigen Versuchen getestet worden war. Bei dieser Methode war es in einzelnen Fällen gelungen, Lymphozytenzellkerne so auf Objektträgern aufzutropfen und zu trocknen, dass eine etwa halbsphärische Form erhalten blieb. Dies wurde damit erreicht, dass Lymphozytensuspensionen, welche nach Standardprotokoll (siehe Material und Methoden, Kap. 2.1.1 und 2.1.2.) aufgearbeitet worden waren, in einem halboffenen System beschleunigt getrocknet wurden.

Mit der Verwendung von Silicagel konnte die Luftfeuchte in der Tropf- und Trocknungsbox lediglich auf etwa 10 % reduziert werden. Die noch vorhandene und die zusätzlich durch den verdampfenden Methylalkohol in die Umgebungsluft gebrachte Feuchtigkeit reichten aus, dass die Zellkerne auf dem OT quellen konnten. Durch diese, zwar reduzierte Quellung war die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur nicht immer reproduzierbar möglich. Durch äußere, nicht beeinflussbare Störgrößen (Ausgangsluftfeuchte, Temperatur) gelang dies nur selten. Auch schwankte die Qualität der erhaltenen Kerne. So waren im Gegensatz zu den publizierten Daten von Lemke *et al.*, 2002, keine Kerne mit halbsphärisch-dreidimensionaler Struktur zu finden, sondern ausschließlich Zellkerne, die etwa 10-25% einer Vollkugel aufwiesen. Bedingt dadurch, dass in der Publikation keine mengenmäßige Angabe zum Anteil der halbsphärischen Zellkerne getroffen wurde, ist nicht sicher beurteilbar, inwieweit die Methode geeignet ist, gezielt und

reproduzierbar dreidimensionale Zellkerne zu erhalten. Da ein befriedigendes Ergebnis bezüglich der Dreidimensionalität nicht erzielt werden konnte, musste nach anderen Möglichkeiten oder Methoden der dreidimensionalen Präparation gesucht werden.

Bei der Verwendung der MCB-Sonden für das Chromosom 5 konnte jedoch, wie bei Lemke *et al.*, 2002, eine differenzierbare Darstellung der fünf Fluorochrome erreicht werden. Diese war denen von Metaphasechromosomen vergleichbar.

4.1.2 Präparation unter absoluten Trocknungsbedingungen

Hierzu wurde eine SpeedVac® Zentrifuge mit Vakuumabsaugung mit entsprechenden konstruktiven Veränderungen verwendet.

Eine halbsphärisch dreidimensionale Zellpräparation unter Trockenbedingungen ist mit diesem Ansatz möglich. Wie sich jedoch bei der Auswertung der Experimente herausstellte, hatte die Vakuumabsaugung einen sehr destruktiven Effekt auf die Zellkerne. Durch den im Kernplasma noch enthaltenen Wasseranteil wurde die Integrität der Kerne völlig zerstört. Der Effekt ist dadurch zu erklären, dass sich durch die Anlage des Vakuums der Siedepunkt so weit verringerte, dass das Wasser in den Präparaten bereits bei Raumtemperatur (siehe Abb.) von der flüssigen in die gasförmige Phase übergang. Dabei wurde die Kernmembran partiell zerstört und das Kernplasma konnte austreten. Somit erwies sich diese Methode als weit weniger praktikabel als die Präparation unter reduzierter Luftfeuchtigkeit.

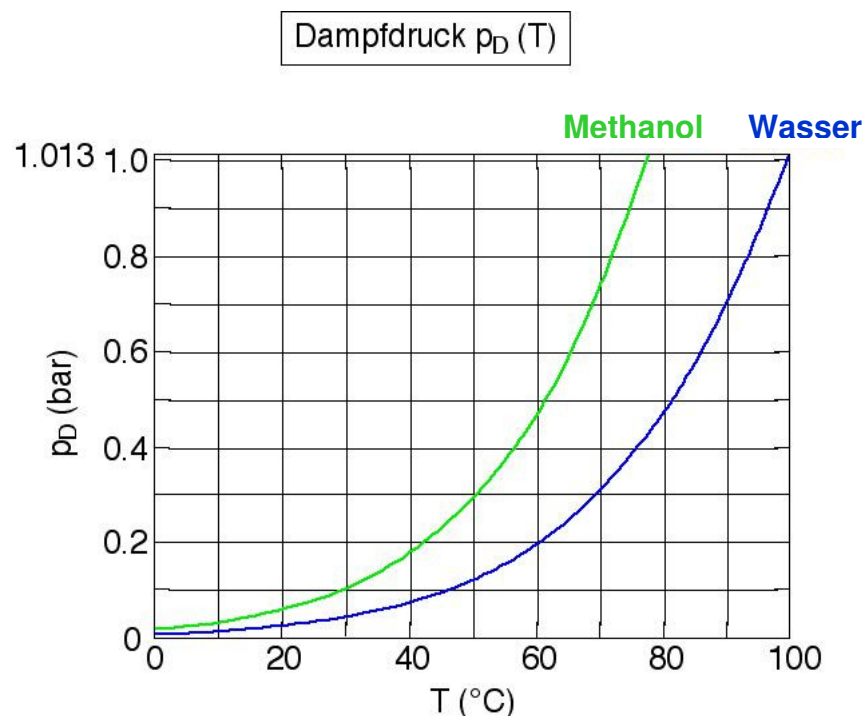


Abb. Dampfdruckkurven von Methanol und Wasser (aus www.unizh.ch)

4.2 Schichtmethode für solide Gewebe (ML-FISH)

Mit dem *multilayer*-FISH (ML-FISH) entstand im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren, mit welchem FISH-Analysen an Gewebeschnitten durchgeführt werden können.

Diese Methode wurde in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Jirikowski vom Institut für Anatomie der FSU Jena entwickelt.

Mit dem *multilayer*-FISH entstand im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein bisher in dieser Form nicht praktiziertes Verfahren, um Chromosomenanalysen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an Schnitten solider Gewebe durchführen zu können. Es wurden bei den Experimenten Schnitte aus humanen Lymphknoten mit Schichtdicken von 0,1 µm bis 1 µm verwendet. Es wurde davon ausgegangen, dass Lymphknotenzellen ähnliche Hybridisierungseigenschaften haben wie Lymphozyten aus peripherem Blut. In den 20 durchgeführten Experimenten konnten jedoch nur viermal Ergebnisse erzielt werden, welche von hinreichend guter Qualität waren. In allen anderen Ansätzen gelang die Hybridisierung nur bei einzelnen DNA-Banken des MCB oder es waren keine Fluoreszenzsignale erkennbar. Als Ursache sind die Reagenzien anzusehen, welche notwendig sind, um das Harz aus den Gewebeschnitten herauszuwaschen. Zudem stellte sich während der Durchführung der Experimente heraus, dass diese Methode einerseits mit einem sehr hohen zeitlichen, personellen und materiellen Arbeitsaufwand verbunden ist. Andererseits sind für die dreidimensionale Rekonstruktion sehr hohe Rechnerleistungen erforderlich, da digitale Verarbeitung an unterschiedlichen Systemen mit verschiedenen Datenformaten durchgeführt werden musste.

Trotzdem zeigte es sich, dass mit dem ML-FISH eine Methode entstand, mit welcher völlig neue Untersuchungen durchgeführt und Fragestellungen bearbeitet werden könnten.

So bietet ML-FISH die Möglichkeit, vergleichende Chromosomenanalysen durchzuführen, um zu klären, inwieweit sich Struktur und Lage von Chromsomen in verschiedenen Geweben gleichen und welche Unterschiede es hierbei gibt. Darüber hinaus wären Untersuchungen an Tumorgeweben durchführbar, bei denen chromosomale Rearrangements erkannt werden könnten, welche ggf. prognostische Aussagen zulassen, so wie dies für verschiedene hämatologische Erkrankungen bereits geschehen ist.

4.3 Direkte Suspensions-Hybridisierung (S-FISH)

Die wesentliche Entwicklung zur Durchführung von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstand, ist das suspensions-FISH-Verfahren, eine Methode, bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an Zellen die sich während der gesamten Prozedur in Suspension befinden. Da mit den Methoden, welche an die zytogenetische Chromosomenpräparation angelehnt waren, keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, entstand die Idee, Zellen in ein flüssiges, blutisotones Medium zu überführen. Das gesamte Protokoll der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung sollte darauf adaptiert übertragen werden.

4.3.1 Probleme des S-FISH (Modifikationen von Steinhäuser *et al.*, 2002)

Die Suspensions-FISH-Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert und 2002 erstmals publiziert. Zu diesem Zeitpunkt gelangen einige Experimente mit Zentromersonden. Im weiteren Verlauf und bei der Anwendung der Methode für andere Sonden zeigten sich einige Probleme und Schwierigkeiten, welche zur Realisierung reproduzierbarer Ergebnisse und für die Bearbeitung zukünftiger Fragestellungen mit dieser Methode gelöst werden mussten.

4.3.1.1 Hohe Verluste von Zellmaterial

Von Anfang an zeigte es sich, dass bei der Vorbereitung des Zellmaterials vor der Hybridisierung sehr große Mengen an Zellen verloren gingen. So blieben anfänglich von der Gesamtzellmenge, welche aus 1 ml Vollblut gewonnen und in Fixativ eingelagert wurden, nach Durchlaufen des S-FISH-Protokolls nur maximal 5 – 10% zur Analyse übrig. Ein Effekt, welcher sich bei der Untersuchung von Materialien mit geringer Ausgangszelldichte (z.B. Amnionflüssigkeit) sehr ungünstig auswirkt bzw. Untersuchungen an diesen Materialien unmöglich machen würde.

Bei der Betrachtung der Zellsuspension nach jedem einzelnen Schritt des S-FISH-Protokolls war erkennbar, dass der größte Anteil an Zellen während oder nach der Denaturierung mittels Formamid 70% verloren ging. Um eine rasche Renaturierung nach diesem Schritt zu verhindern, wurde die Formamidsuspension nach erfolgter Denaturierung auf 4 °C abgekühlt und auch bei dieser Temperatur zentrifugiert. Da in der Routine der Molekularen Zytogenetik die denaturierten OT's in -20 °C kalten Alkohol gestellt werden, ist nicht bekannt, dass Formamid 70% schon bei 4 °C eine sehr ölige Lösung mit erhöhter Dichte ist. Dadurch ließen sich die Zellkerne im gekühlten Zustand nicht zentrifugieren. Es musste deshalb ein Medium gefunden

werden, in welchem einerseits die Zellkerne gut denaturiert werden konnten, das andererseits aber die Möglichkeit, die Zellkerne nach der Denaturierung zentrifugieren zu können, nicht negativ beeinflusst. Zudem sollte das Medium auch die Größe und die Struktur der Zellkerne nicht zu sehr beeinflussen. Da ohnehin einige Schritte des Protokolls in isotoner Kochsalzlösung ablaufen, lag es nahe, auch die Denaturierung bei gesteigerter Temperatur (95 °C statt 72 °C bei Formamid 70%) in 0,9% NaCl-Lösung ablaufen zu lassen. Es zeigte sich, dass die Ergebnisse hier vergleichbar zur vorherigen Denaturierungsmethode waren.

4.3.1.2 Varianz der Hybridisierungsergebnisse zwischen den unterschiedlichen Sondenklassen

Zu Beginn der Experimente mit S-FISH wurden ausschließlich Zwei- und Dreifarbkombinationen der Zentromere 6, 16 bzw. 18 verwendet. Dies ist einerseits damit zu begründen, dass Zentromer-Sonden aufgrund der vielen repetitiven Sequenzen sehr gut hybridisieren und dadurch weniger störanfällig sind. Andererseits ist die Stärke der Fluoreszenzsignale bei diesen kommerziellen Sonden besonders gut.

Im weiteren Verlauf sollten weitere Sondenklassen mit dem S-FISH-Verfahren etabliert werden. Besonderer Wert wurde dabei auf Vielfarb-FISH-Sonden wie das *multi color banding* (MCB) gelegt. Trotz der guten Ergebnisse mit den Zentromersonden konnte zunächst keine erfolgreiche Hybridisierung mit *wcp*- und MCB-Sonden durchgeführt werden.

Dafür konnten experimentell zwei Gründe ermittelt werden.

4.3.1.2.1 Konzentration des DNA-Hybridisierungsansatzes

Für alle Experimente wurde die Menge der DNA-Sonde pro Hybridisierungsansatz entsprechend der Materialmenge angepasst. Dies konnte jedoch immer nur ein Näherungswert sein, da nie völlig klar ist, welche Zellzahl vor der Hybridisierung übrig ist. Bei den kommerziellen Zentromersonden konnten mit etwa der doppelten Sonden-Menge gute Hybridisierungsergebnisse erzielt werden. Dies wurde auf *wcp*- und MCB-Sonden übertragen. Es stellte sich jedoch heraus, dass die einzusetzende DNA-Menge etwa vier- bis fünfmal höher sein musste, um aussagefähige Fluoreszenzsignale zu erhalten.

4.3.1.2.2 Beeinflussung der Hybridisierung durch Colchizin

Bei der Aufarbeitung des peripheren venösen Blutes wird vor der Präparation Colchizin zur Arretierung der Chromosomen dem Kulturansatz zugegeben. Je nach Einwirkzeit können die Chromosomen dadurch in jeder beliebigen Phase des Zellzyklus fixiert werden. Für die Etablierung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zeigte sich eine zielgerichtete Arretierung der Chromosomen in einer bestimmten Zellzyklusphase als nicht notwendig. Aus diesem Grund wurde zur Steigerung der Ausbeute an Zellkernen bei der Blutpräparation wegen des zu dieser Zeit noch auftretenden hohen Materialverlustes während des S-FISH-Protokolls auf die Verwendung von Colchizin verzichtet. Es konnten auch da erst Ergebnisse nach der Erhöhung der Sondenkonzentration erzielt werden. Somit wurde dieser Änderung des Protokolls zunächst keine Bedeutung beigemessen.

Bei Folgeuntersuchungen im Rahmen einer weiteren Promotion, bei der zunächst herkömmlich präpariertes Blut (mit Colchizin) verwendet wurde, konnten, bei ansonsten unverändertem Protokoll, keine erfolgreichen Hybridisierungen durchgeführt werden.

Versuche, bei denen Hybridisierungen auf Lymphozyten, welche jeweils nach der einen bzw. der anderen Methode präpariert worden waren, zeigten jedoch eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Verwendung von Colchizin. Eine genaue Ursache hierfür konnte nicht ermittelt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Wirkung des Colchizins auf den Spindelapparat bzw. Intrazellulärfilamente einen Einfluss auf die Integrität des Zellkernes hat und damit die Hybridisierung beeinflusst.

4.3.1.3 Kernmobilität bei der mikroskopischen Analyse

Ein wesentliches Problem, welches sich darstellte, als die ersten Experimente mit Vielfarb-FISH-Sonden gelangen, war die Mobilität der Zellkerne auf dem Objektträger. Bei dem ursprünglichen Protokoll (Steinhaeuser *et al.*, 2002) wurden die Kerne als letzter Schritt in DAPI/*Vectashield* resuspendiert und damit auch gegengefärbt. *Vectashield* ist ein zähflüssiges Medium, welches sich bei steigender Temperatur zunehmend verflüssigt. Dieser Effekt hatte bei den Zentromerexperimenten noch keinen erkennbaren Einfluss, da durch die Signalintensität die Belichtungszeiten der einzelnen Fluorochrome entsprechend kurz waren. Bei den Vielfarb-FISH-Experimenten, bei denen auch signalschwächere Fluorochrome integriert sind, war bei Stapelaufnahmen (ca. 25 – 50 Einzelbilder pro

Fluorochrom) in allen Farbkanälen ein Versatz der jeweiligen Fluoreszenzsignale zu erkennen. Dieser Effekt war so ausgeprägt, dass eine Korrektur mittels Software nicht in genügender Weise möglich war.

Es wurden verschiedene Möglichkeiten zur Fixierung der Kerne getestet.

4.3.1.3.1 Fixierung mit Gelatine

Zunächst wurde versucht, die gefärbten Kerne vor bzw. nach der DAPI-Gegenfärbung in Gelatine einzugießen. Dieser Versuch erbrachte keine hinreichend guten Ergebnisse. Dies ist dadurch zu begründen, dass Gelatine eine relativ hohe Eigenfluoreszenz besitzt, was dazu führt, dass der Gelatineblock bei Anregung mit Licht in den jeweiligen Wellenlängen optisch wesentlich dichter erscheint und mikroskopische Strukturen bzw. Fluoreszenzsignale nicht mehr differenzierbar sind.

4.3.1.3.2 Fixierung mittels Agarosegel

Das Problem der Eigenfluoreszenz konnte mit Agarosegel behoben werden. Um auch die Gegenfärbung zu gewährleisten, wurde ein DAPI-Agarose-Gel (1%) hergestellt und zusätzlich die Kerne vor der endgültigen Fixierung mit DAPI/*Vectashield* vorgefärbt. Vergleichsversuchen ließen erkennen, dass die Signalqualität und die Differenzierbarkeit der mikroskopischen Strukturen dadurch noch gesteigert werden kann.

4.3.2 Möglichkeiten und Grenzen des S-FISH

Mit dem S-FISH entstand eine Methode, welche dreidimensionale Zellpräparation mit FISH-Analysen kombiniert. Besonderes Merkmal dieser Methode ist, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen als Analysematerial Verwendung finden kann. Voraussetzung ist hierbei nur die Aufbewahrung in flüssigem Medium. So wurde inzwischen die Nutzbarkeit erfolgreich für Lymphozyten, Amniozyten und Spermien getestet. Aus den resultierenden Ergebnissen ist zu erwarten, dass weitere Zelltypen (z.B. Oocyten), welche sich in Suspension bringen lassen, ebenfalls aussichtsreich getestet werden könnten.

Seitens der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung konnten anschauliche Ergebnisse für eine Reihe verschiedener DNA-Sonden erreicht werden. Mit den verwendeten Sonden (Zentromersonden, *wcp*- und *pcp*-Sonden, Vielfarb-FISH-Sonden) welche exemplarisch und zufällig ausgewählt worden waren, konnte demonstriert werden, dass Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit einem sehr großen Spektrum an

verschiedenartigen Proben durchführbar ist. Es ist davon auszugehen, dass andere, hier nicht getestete Sonden (Mikrodeletionssonden, Telomerproben, etc.) ebenfalls erfolgreich eingesetzt werden könnten.

Wie mittels Größenauswertung der Zellkerne nach jedem Schritt des S-FISH-Protokolls, gezeigt werden konnte, nähern sich die Zellkerne bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wieder ihrer nativen Größe an. Dies gelingt bei gleichzeitigem Erhalt der dreidimensionalen Struktur.

Begrenzend für S-FISH-Analysen bleibt auch nach Überarbeitung des ursprünglichen Protokolls die Zellmenge. Zwar konnte mit der Veränderung der Denaturierung und der Optimierung einzelner Waschschrte der Materialverlust um etwa die Hälfte reduziert werden, aber bei sehr geringer Ausgangsmenge kann der dann noch stärker ins Gewicht fallende Zellverlust eine Analyse weiterhin erschweren, wie z.B. bei Chorionzottenbiopat oder Amniozentesematerial.

Als ein wesentliches Problem stellte sich im Verlauf die Aufarbeitung des Zellmaterials heraus. Wird das Untersuchungsmaterial mit Colchizin zur Arretierung der Zellen präpariert, sind S-FISH-Analysen nicht durchführbar. Dies ist bei Material zu berücksichtigen, welches nicht unmittelbar vor der Analyse vom Untersucher gesondert aufgearbeitet wurde.

Eine Möglichkeit, welche der S-FISH eröffnet, wurde in der Arbeitsgruppe um H. Tönnies getestet. In dieser Arbeitsgruppe wurde das Verfahren für durchflusszytometrische Untersuchungen (*flow-sorting*) angewandt. Nach mündlicher Übermittlung durch Kollegen der Arbeitsgruppe Tönnies (Berlin) zeigte sich, ohne dass dies primär bei der Entwicklung beabsichtigt war, dass das S-FISH in der Routine des *flow-sorting* gut anwendbar ist. Publierte Daten liegen hierzu bisher nicht vor.

4.4 Software und Analyse

Bei allen Ansätzen zur Realisierung der 3D-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bleibt letztendlich die Fragestellung nach geeigneter Analyse- und Rekonstruktionssoftware. Diese sollte einerseits eine effektive Schnittstelle bieten, um Bilder, welche mit CCD-Kamera am Mikroskop aufgenommen werden ohne Datenverlust weiterzuverarbeiten. Andererseits sollten auch Instrumente für Längen- bzw. Volumenmessungen und ein Rekonstruktions-*Tool*, zum Erstellen einer 3D-Projektion, enthalten sein.

Zu Beginn der Arbeit stand lediglich die *Isis*[®] *FISH Imaging Software* der Fa. Metasystems zur Verfügung. Diese Software ist jedoch nur sehr ungenügend für Untersuchungen an dreidimensionalen Strukturen geeignet. Ursächlich dafür ist zum einen ein sehr einfach geartetes Stapelaufnahme-Modul, bei dem keine Start- und Endpunktmarkierung im Z-Fokus erfolgt, sondern lediglich manuell Werte für Schichtdicke und Schichtabstand vorgegeben werden. Hieraus ergibt sich, dass häufig zu viele oder zu wenige Bilder aufgenommen werden, um den kompletten Kern abdecken zu können. Außerdem wird der Startpunkt, bei welchem die Stapelaufnahme beginnt, von der Software gesetzt und ist für den Untersucher mitunter nicht nachvollziehbar. Hauptproblem der *Isis*-Software ist jedoch die fehlende Möglichkeit, die einzelnen Stapelbilder zu einer 3D-Projektion zu rekonstruieren und daran Messungen durchzuführen. Eine entsprechende Erweiterung war auf Nachfrage nicht geplant.

Während der Anfangszeit der vorliegenden Arbeit eröffnete sich auch die Gelegenheit, Untersuchungen an einem Laserscanning-Mikroskop (*LSM 510 Meta*), welches direkt in den Räumlichkeiten der Zeiss GmbH stand, durchzuführen. Dieses Mikroskop, kombiniert mit der entsprechenden Software, stellte sich als sehr potentes System für dreidimensionale FISH-Analysen heraus. Zum einen ist, durch Verwendung von Laserlicht zur Anregung der Fluorochrome, die Signalqualität und die Auflösung der Bilder sehr hoch, zum anderen können 3D-Projektionen durch die direkte Vernetzung von Mikroskop, CCD-Kamera und Software ohne Datenverlust erstellt werden. Problematisch ist die Komplexität der Software, welche durch eine Vielzahl an veränderlichen Parametern (Blendenöffnung, Tunnelstrom des Lasers etc.) bei der Bildaufnahme große Veränderungen bei der Signalqualität zulässt. Dies konnte anfänglich jedoch durch direkte personelle Betreuung kompensiert werden. Durch Personalveränderungen war diese intensive Kooperation nicht dauerhaft

möglich und der Erwerb eines solchen Systems (inkl. Schulung) für die Auswertungen aus Kostengründen nicht möglich.

Deshalb wurde zunächst nach einer Möglichkeit gesucht, die Mängel der vorhandenen Software durch ein zusätzliches Programm zu überbrücken. Bei der Suche stellte sich das Internet als geeignete Plattform heraus. So konnten zwei Programme gefunden werden, welche zum freien *download* als zeitlich begrenzte Testversionen erworben werden konnten. Dies war einerseits die *AmiraTM Software* der Mercury Computer Systems, Inc. und andererseits die *VolViewTM Software* der Firma Kitware, Inc. Beide basieren ursprünglich auf der Verarbeitung von CT- und MRT-Bildern und bieten die Möglichkeit, viele gängige Grafikformate (*.tif, *.jpg, *.bmp) importieren und verarbeiten zu können. Da die *Isis*-Software für diese Grafikformate eine Export-Funktion bietet, erschien dies als günstige und funktionelle Möglichkeit. In der Anwendung zeigten sich aber grundlegende Probleme. So ist der Datenverlust, welcher durch das Export-Import-Verfahren geschieht, sehr groß. Außerdem erscheinen einzelne Einstellungen zwischen der *Isis*-Software und der jeweils verwendeten Rekonstruktionssoftware nicht kompatibel. So müssen Datenpunkte wie Gesamtbildgrösse, Abstand von Bildpunkten (Schichtdicke) sowie x- und y-Ausdehnung übertragen werden. Die damit erstellten Projektionen waren von sehr unbefriedigender Qualität, da vor allem die Berechnung der z-Achse längenmässig nicht dem Original entsprach und immer wesentlich kleiner war.

Der Erwerb der *AnalysisD[®]*-Software (jetzt *CellIP[®]*) inklusive höher auflösender CCD-Kamera für das Labor der Molekularen Zytogenetik konnte einige dieser Probleme lösen. So gelang es den Mitarbeitern der Fa. *Olympus Soft Imaging Solutions GmbH* eine Schnittstelle zu schaffen, über welche einige motorisierte Mikroskopfunktionen (Z-Trieb, Filterwechsel, Blendenöffnung) gesteuert werden können. Mit der zugehörigen CCD-Kamera (*F-View2[®]*) können aufgenommene Stapelbilder direkt in die Software geladen werden. Dadurch gibt es zwischen Bildaufnahme und Bildverarbeitung keinen Datenverlust. Zur 3D-Rekonstruktion bietet die Software einige Module. So kann die Rekonstruktion auf Basis der minimalen oder der maximalen Intensitäten erfolgen. Als aussagekräftigste Rechenroutine erwies sich aber die Projektion der Isoflächen (siehe Bilder in 3.3). Nachteilig gegenüber der Meta-Software zeigte sich eine weniger effektive Kompensation des so genannten *Pixel-Shift*.

Durch diesen Effekt ist die Kernform nach Rekonstruktion mit *AnalysisD[®]* mitunter mehr ellipsoid. Insgesamt erwies sich die *AnalysisD[®]*-Software jedoch als sehr gut

anwendbare Softwarelösung, da auch das Benutzerinterface sehr intuitiv zu bedienen und die Software nicht mit zu vielen Einstellmöglichkeiten überladen ist.

4.5 Vergleiche mit anderen 3D-Protokollen

Literaturrecherchen zeigten, dass das 3D-Protokoll von Solovei et al. 2002, welches von der Arbeitsgruppe um T. Cremer (Ludwig-Maximillan-Universität, München) verwendet wird, neben dem Protokoll dieser Arbeit derzeit das einzige zu sein scheint, das zur Bearbeitung von Fragestellungen an dreidimensional erhaltenen Zellkernen Anwendung findet. Bei diesem Protokoll werden zwei Zellarten verwendet. Zum einen humane Fibroblasten und zum anderen periphere Blutlymphozyten. Die Fibroblasten werden direkt auf Deckgläsern kultiviert, die Lymphozyten mittels eines Dichtegradienten unter Zentrifugation von anderen Blutzellbestandteilen getrennt und dann sekundär auf Deckgläser aufgebracht. Der Vorteil gegenüber der Hauptmethode (S-FISH) der vorliegenden Arbeit liegt darin, dass zunächst keine Quellungsvorgänge die Zell- bzw. Kernstruktur verändern. Jedoch ist die Verwendung von Deckgläsern, aufgrund ihrer geringen Dicke und der damit verbundenen Brüchigkeit durchaus problematisch. Darüber hinaus kommen im Protokoll von Solovei *et al.*, 2002, in der Vorbereitung der Deckgläser bzw. im weiteren Verlauf der Hybridisierung Lösungen wie z.B. Flusssäure (Fluorwasserstoffsäure) und Formamid zum Einsatz. Diese haben einerseits eine sehr stringente Wirkung auf das Untersuchungsmaterial, andererseits aber auch ein nicht unerhebliches gesundheitsschädigendes Potential. Im S-FISH-Protokoll der vorliegenden Arbeit kommen vergleichbare Lösungen nicht bzw. nur in äußerst geringen Mengen (z.B. als Bestandteil der Hybridisierungsmixe) zum Einsatz.

Die Kultivierung bzw. Anheftung der Zellen auf Deckgläsern behebt von vornherein das Problem der Kernmobilität bei der Auswertung. Jedoch wachsen Zellen auf Glas wesentlich langsamer bzw. schlechter als auf Kunststoff (Kulturflaschen), und den Aufbewahrungszeitraum so fixierter Zellen, ohne dass die Hybridisierungsqualität schlechter wird, geben die Autoren mit lediglich drei Monaten an. In Fixativ (Methanol/Eisessig) gelagerte Zellen, so wie sie in dieser Arbeit und bei den meisten zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchungen verwendet werden, stehen auch noch nach mehreren Jahren ohne Qualitätsverlust für FISH-Analysen zur Verfügung. Das Protokoll von Solovei *et al.*, 2002 verweist auf die Möglichkeit, 3D-Analysen an peripheren Blutlymphozyten durchführen zu können. Bei der

Literaturrecherche gelang jedoch ausschließlich die Ermittlung von Publikationen, für deren zugrunde liegenden Untersuchungen humane Fibroblasten verwendet wurden. Ergebnisse zu Lymphozyten werden nicht beschrieben. Da von daher keine Aussagen über Hybridisierungsergebnisse und Qualität der dreidimensionalen Strukturen gemacht wurden, sind Vergleiche hierzu mit dem Protokoll der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Mit den Untersuchungen welche auf Basis des S-FISH-Protokolls durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass erfolgreiche Hybridisierungen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen möglich ist. Untersuchungen an humanen Fibroblasten, wie sie von T. Cremer und Kollegen in ihren Publikationen (z.B. Bolzer *et al.*, 2005; Cremer *et al.*, 2006) beschrieben werden, haben den Vorteil, dass Fibroblastenkerne kleiner und wesentlich flacher sind als Lymphozytenkerne, welche eine annähernd kugelige Form besitzen. Entsprechend beschreiben die Autoren, dass bei den jeweiligen 3D-Analysen erkennbar war, dass im Fibroblastenkern ein bis maximal zwei (bei den akrozentrischen Chromosomen) Chromosomen übereinander liegen. Bei FISH-*banding*-Experimenten mit S-FISH, bei denen zwar immer nur maximal zwei homologe Chromosomen gefärbt waren, war jedoch erkennbar, dass neben den dargestellten Chromosomen in allen Dimensionen noch hinreichend Raum für mehrere Chromosomendomänen war. Insgesamt ist das S-FISH eine Methode, welche auf eine Vielzahl von Zellarten angewendet werden kann. Naturnahe Größenverhältnisse müssen jedoch über eine Reihe Zwischenschritte künstlich wiederhergestellt werden. Die Methode nach Solovei *et al.*, 2002, umgeht dies mit einem anderen Ansatz. Ergebnisse über Analysen zu anderen Zellen als Fibroblasten wurden jedoch bisher nicht publiziert (Walter *et al.*, 2006).

4.6 Ausblick

Mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten und etablierten 3D-FISH-Methoden wurde die Basis für eine Reihe 3D-FISH-Untersuchungen geschaffen. Perspektivisch sind zunächst noch kleinere Probleme der Stabilität und Qualität des Verfahrens zu verbessern. So konnten noch nicht alle im Institut für Humangenetik und Anthropologie existierenden DNA-Sonden für das S-FISH-Verfahren getestet und etabliert werden, so z.B. der subcenM-Sondenmix (Starke *et al.*, 2003) oder lokusspezifische Sonden (LSI-Sonden). Auf technischer Seite ist zum einen die Problematik des Zellverlustes weiter zu verbessern. So ist es denkbar, dass mit der Auswaschung des Fixativs über eine absteigende Ethanol-Reihe statt mit einem einzelnen Methanol-Schritt noch eine weitere Schonung der Zellen und somit eine größere Endmenge erzielt werden kann. Ein anderer Punkt, an dem das Protokoll zukünftig noch verbessert werden kann, ist die Konzentration der verwendeten DNA-Sonde. Derzeit wird mit dem Ziel einer guten Signalqualität mit einer sehr großen Menge Sonde gearbeitet. Aus ökonomischen Gründen wäre es daher sinnvoll zu überprüfen, inwieweit die Konzentration reduziert werden kann, ohne dass eine Minderung der Signalqualität auftritt. Hierbei könnte der Einsatz von Mikrowellenbestrahlung hilfreich sein. Signalverbesserungen und eine Verkürzung der Hybridisierungszeit konnte dabei bereits bei Experimenten an Metaphasechromosomen gezeigt werden (Weise *et al.*, 2005). Um die Veränderungen, welche die Zellkerne durch Präparation, Fixierung und das S-FISH-Protokoll erfahren, weiter zu reduzieren, wurde schon im Verlauf dieser Arbeit die Idee entwickelt, Lymphozyten aus einer Kultur mittels Dichtegradient (z.B. Ficoll®) direkt zu isolieren. Damit könnten Quellungsveränderungen durch die Lösungen während der Zellpräparation (hypotone KCl, Fixativ) von vornherein vermieden werden. Aus zeitlichen Gründen wurde diese Idee nicht weiter verfolgt. Sie ist jedoch für Nachfolgepromotionen interessant.

Durch die Einsatzmöglichkeit des S-FISH für viele in Suspension zu bringende Zellen sind eine Reihe an unterschiedlichen Untersuchungen möglich. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit entstand die Idee, 3D-Analysen an humanen Spermien und Oocyten durchzuführen. Im Rahmen einer Nachfolgepromotion werden bereits erfolgreich Analysen an Spermien durchgeführt. Darüber hinaus sind bereits erste Vergleichs-Experimente zu den morphologischen Veränderungen der X-Chromosomen bei unauffälligen Frauen als Korrelat der Inaktivierung eines X-

Chromosomes durchgeführt worden. Im Rahmen weiterer Promotionen sind hierbei zukünftig noch vergleichbare Untersuchungen an Zelllinien mit XO-Karyotyp (Ullrich-Turner-Syndrom; Ford *et al.*, 1959) und XXX-Karyotyp (Triple-X-Syndrom; Johnston *et al.*, 1961) geplant.

Von klinischem Interesse könnten zukünftig Untersuchungen zu Lokalisationen einzelner Chromosomen bzw. der homologen Paare zueinander im Kern oder die Lage von Translokationspartnern bei häufigen Veränderungen sein. Damit ließen sich z.B. Fragestellungen bearbeiten, inwieweit die Lokalisation im Kern bzw. die Positionen der einzelnen Chromosomen zueinander ausschlaggebend für die Entstehung chromosomaler Rearrangements ist.

Wenn weitere Tests die Probleme der Stabilität des ML-FISH beheben könnten, wären auch eine Reihe interessanter Fragestellungen mit diesem Verfahren denkbar. So könnten molekularzytogenetisch Veränderungen in soliden Tumoren untersucht und diese dann in Bezug auf Chromosomenpositionen gesetzt werden. Auch vergleichende Untersuchungen zu Fragen der Chromosomenmorphologie bei unterschiedlichen Zellen und Geweben wären denkbar.

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in dreidimensional erhaltenen Interphasekernen zu etablieren. Zu Beginn stand dafür eine Methode zur Verfügung, welche auf Chromosomenpräparationstechniken der Zytogenetik basierte. Da es sich zeigte, dass mit dieser Methode zwar gute FISH-Ergebnisse produziert werden können, aber die Dreidimensionalität der Kerne nicht in der anvisierten Weise zu realisieren ist, wurde die Methode weiterentwickelt.

Die Erweiterung der Methode beinhaltete zusätzlich die Anlage eines Vakuums. Diese Vakuumabsaugung hatte jedoch einen sehr destruktiven Effekt auf die Kerne, was sich negativ auf den Erhalt der dreidimensionalen Struktur auswirkte.

Parallel zu den Experimenten mit den Trocknungsmethoden wurde an einer 3D-Technik gearbeitet, welche auf Gewebeschnitten basierte und als ML-FISH (*multi-layer-FISH*) bezeichnet wurde. Bei dieser Methode wurden in Epoxidharz eingebettete Gewebeproben mittels Ultramikrotom geschnitten und nach Entfernung des Harzes FISH-gefärbt. Mit dieser Methode konnten in einigen Experimenten sehr gute Hybridisierungsergebnisse erzielt werden. Ein Teil der Versuche brachte jedoch keine Ergebnisse. Die Ursachen hierfür konnten nicht geklärt werden. Die Rekonstruktion mittels Software war zum damaligen Zeitpunkt nur unter unverhältnismäßigem zeitlichen und personellen Aufwand möglich. Zudem gestaltete sich auch die Reproduzierbarkeit der Rekonstruktion schwierig.

Da mit den Trocknungsmethoden zwar qualitativ gute Hybridisierungen durchgeführt werden konnten, aber die Dreidimensionalität der Kerne nicht dem anvisierten Ziel entsprach, wurde ein Protokoll entwickelt, mit welchem die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung komplett in Suspension durchgeführt werden sollte. Die auf dieser Idee basierende Entwicklung wurde *suspension-FISH* (S-FISH; Steinhäuser *et al.*, 2002) genannt. Es erfolgten eine Reihe Tests verschiedener Sonden für dieses Protokoll. Die ersten Versuche wurden mit Zentromersonden, teilweise kombiniert mit *wcp*-Sonden, durchgeführt. Dabei traten, bei der Erweiterung der Versuche auf immer mehr verschiedene DNA-Sonden verschiedene Probleme auf, welche im Weiteren verbessert werden konnten bzw. gelöst wurden. S-FISH wurde schließlich für eine große Anzahl, in der molekularzytogenetischen Routine eingesetzten Sonden, getestet und etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Methode für

verschiedene Zellarten, welche in Suspension zu bringen sind, angewendet werden kann.

Neben diesen Besonderheiten des *suspension*-FISH konnte auch der Nachweis erbracht werden, dass durch die Verwendung isotoner NaCl-Lösung die Zellkerne über den Verlauf des Protokolls wieder ihrer nativen Größe angenähert werden können.

Durch diese Arbeit wurde der Grundstein für eine neue Art von Forschungen an Interphasekernen, wie z.B. zu morphologischen Unterschieden bei X-Inaktivierung oder Lokalisationen von Chromosomen zueinander, bei der Entstehung von chromosomalen Rearrangements, geschaffen.

VI. Literaturverzeichnis

Arnold J. (1879). Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Virchows arch path Anat* 77: 181-206

Arnoldus E.P., Peters A.C., Bots G.T., Raap A.K., van der Ploeg M. (1989). Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum. *Hum Genet* 83 (3): 231-234

Arnoldus E.P., Noordermeer I.A., Peters A.C., Raap A.K., Van der Ploeg M. (1991). Interphase cytogenetics reveals somatic pairing of chromosome 17 centromeres in normal human brain tissue, but no trisomy 7 or sex- chromosome loss. *Cytogenet Cell Genet* 56 (3-4): 214-216

Arrighi F.E., Hsu T.C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86

Bartova E., Kozubek S., Jirsova P., Kozubek M., Lukasova E., Skalníková M., Cafourková A., Koutná I., Paseková R. (2001). Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma* 110 (5): 360-370

Bloom S.E., Goodpasture C. (1976). An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum Genet* 34: 199-206

Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Müller S., Eils R., Cremer C., Speicher M.R., Cremer T. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 2005 3(5):e157

Boveri T. (1909). Der Blastomerenkern von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Exp Zellforschung* 3: 181-268

Brown R. (1831). Prodrömus florae Novae Hollandiae et insulae.

Carmo-Fonseca M., Cunha C., Custodio N., Carvalho C., Jordan P., Ferreira J., Parreira L. (1996). The topography of chromosomes and genes in the nucleus. *Exp Cell Res* 229 (2): 247-252

Caspersson T., Faber S., Foley G.E., Kudnyowsky J., Modest E., Wagh V., Zech L. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49: 219-222

Caspersson T., Zech L., Johansson C. (1970). Analysis of human metaphase chromosomes set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res* 62: 490-492

Caspersson T., Lomakka G., Zech L. (1971). The 24 fluorescence patterns of human metaphase chromosomes- distinguishing characters and variability. *Hereditas* 67: 89-102

- Chaly N., Brown D.L. (1988).** The prometaphase configuration and chromosome order in early mitosis. *J Cell Sci* 91 (Pt 3): 325-335
- Chudoba I., Plesch A., Lörch T., Lemke J., Claussen U., Senger G. (1999).** High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84: 156-160
- Claussen U., Michel S., Mühlig P., Westermann M., Grummt U.W., Kromeyer-Hauschild K., Liehr T. (2002).** Demystifying chromosome preparation and the implications for a concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res* 98: 136-146
- Comings D.E. (1968).** The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am J Hum Genet* 20:440-460
- Comings D.E., Okada T.A. (1970).** Association of chromatin fibers with the annuli of the nuclear membrane. *Exp Cell Res* 62 (2): 293-302
- Cremer C., Zorn C., Cremer T. (1974).** An ultraviolet laser microbeam for 257 nm. *Microsc Acta* 75 (4): 331-337
- Cremer T., Cremer C., Baumann H., Luedtke E.K., Sperling K., Teuber V., Zorn C. (1982a).** Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV- microbeam experiments. *Hum Genet* 60 (1): 46-56
- Cremer T., Cremer C., Schneider T., Baumann H., Hens L., Kirsch-Volders M. (1982b).** Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments. *Hum Genet* 62 (3): 201-209
- Cremer T., Lichter P., Borden J., Ward D.C., Manuelidis L. (1988).** Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 80(3):235-246.
- Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Muller S., Solovei I., Fakan S. (2006).** Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18(3):307-316
- Dutrillaux B., Lejeune J. (1971).** A new technic of analysis of the human karyotype. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 272: 2638-2640
- Ellison J.R., Barr H.R. (1972).** Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high A: T content in *Samoaia leonensis*. *Chromosoma* 36: 375-390
- Emmerich P., Loos P., Jauch A., Hopman A.H., Wiegant J., Higgins M.J., White B.N., van der Ploeg M., Cremer C., Cremer T. (1989).** Double in situ hybridization in combination with digital image analysis: a new approach to study interphase chromosome topography. *Exp Cell Res* 181 (1): 126-140.

Ferguson M., Ward D. C. (1992). Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T- lymphocyte nuclei. *Chromosoma* 101 (9): 557-565.

Flemming W. (1880). Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. *Arch Mikr Anat* 18: 151-259

Ford C.E., Miller O.J., Polani P.E., de Almeida J. C., Briggs J.H. (1959). A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet* 1: 711-713

Johnston A.W., Ferguson-Smith M.A., Handmaker S.D., Jones H.W., Jones G.S. (1961). The triple-X syndrome. Clinical, pathological, and chromosomal studies in three mentally retarded cases. *Br Med J.* 21;5259:1046-1052

Henikoff S. (1997). Nuclear organization and gene expression: homologous pairing and long- range interactions. *Curr Opin Cell Biol* 9 (3): 388-395

Hens L., Kirsch-Volders M., Verschaeve L., Susanne C. (1982). The central localization of the small and early replicating chromosomes in human diploid metaphase figures. *Hum Genet* 60 (3): 249-256

Hiraoka Y., Dernburg A.F., Parmelee S.J., Rykowski M.C., Agard D.A., Sedat J.W. (1993). The onset of homologous chromosome pairing during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *J Cell Biol* 120 (3): 591-600

Hopman A.H., Wiegant J., Tesser G. I., Van Duijn P. (1986). A non-radioactive in situ hybridization method based on mercurated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands. *Nucleic Acids Res* 14: 6471-6488

Howell W.M., Denton T.E., Diamond J.R. (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* 31: 260-262

Hsu T.C. (1952). Mammalian chromosomes in vitro. The karyotype of man. *J Hered* 43: 167-172

Hooke R. (1665). Micrographia.

John H.A., Birnstiel M.L. Jones K.W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223(206): 582-587

Kleinig H., Sitte P. (1984). Zellbiologie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Knippers R. (2001). Molekulare Genetik. Stuttgart, New York. Georg Thieme Verlag.

Kuechler A., Müller C.R., Liehr T., Claussen U. (2001). Detection of microdeletions in the short arm of the X chromosome by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 95: 12-16

Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6633-6637

Lee C., Wevrick R., Fisher R.B., Ferguson-Smith M.A., Lin C.C. (1997). Human centromeric DNAs. *Hum Genet* 100: 291-304

Leitch A.R., Brown J.K., Mosgoller W., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. (1994). The spatial localization of homologous chromosomes in human fibroblasts at mitosis. *Hum Genet* 93 (3): 275-280

Lejeune J. (1959). Le Mongoloïisme: Premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Genet Sem Hop* 1: 41-49

Lemke J., Claussen J., Michel S., Chudoba I., Muhlig P., Westermann M., Sperling K., Rubtsov N., Grummt U. W., Ullmann P., Kromeyer-Hauschild K., Liehr T., Claussen U. (2002). The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71: 1051-1059

Lengauer C., Eckelt A., Weith A., Endlich N., Ponielies N., Lichter P., Greulich K.O., Cremer T. (1991). Painting of defined chromosomal regions by in situ suppression hybridization of libraries from laser-microdissected chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 56 (1): 27-30

Lengauer C., Riethman H.C., Speicher M.R., Taniwaki M., Konecki D., Green E.D., Becher R., Olson M.V., Cremer T. (1992). Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2. *Cancer Res* 52 (9): 2590-2596

Lesko S. A., Callahan D.E., LaVilla M.E., Wang Z.P., Ts'o P.O. (1995). The experimental homologous and heterologous separation distance histograms for the centromeres of chromosomes 7, 11, and 17 in interphase human T-lymphocytes. *Exp Cell Res* 219 (2): 499-506

Lichter P., Cremer T., Tang C.J., Watkins P.C., Manuelidis L., Ward D.C. (1988). Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (24): 9664-9668

Liehr T., Heller A., Starke H., Rubtsov N., Trifonov V., Mrasek K., Weise A., Küchler A., Claussen U. (2002a). Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 9: 335-339

Liehr T., Heller A., Starke H., Claussen U. (2002b). FISH banding methods: applications in research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2: 217-225

Liehr T., Starke H., Weise A., Lehrer H., Claussen U. (2004). Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol* 19(1):229-237

Liehr T., Starke H., Heller A., Kosyakova N., Mrasek K., Gross M., Karst C., Steinhäuser U., Hunstig F., Fickelscher I., Kuechler A., Trifonov V., Romanenko S.A., Weise A. (2006). Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. *Cytogenet Genome Res* 114:240–244

Leeuwenhoek A. van (1715-1722). Opera omnia.

Manuelidis L. (1985). Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum Genet* 71 (4): 288-293

Mosgoller W., Leitch A.R., Brown J.K., Heslop-Harrison J.S. (1991). Chromosome arrangements in human fibroblasts at mitosis. *Hum Genet* 88 (1): 27-33

Müller S., O'Brien P.C., Ferguson-Smith M.A., Wienberg J. (1998). Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 33: 445-452

Nederlof P.M., Robinson D., Abuknesha R., Wiegant J., Hopman A.H., Tanke H.J., Raap A.K. (1989). Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 10: 20-27

Nelle H. (2005). Dissertation: Charakterisierung der chromosomalen Bandenaufspaltung an den humanen Chromosomen 5, 6, 18, 19, 20 und X. Institut für Humangenetik und Anthropologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Pardue M. L., Gall J.G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 69 (64): 600-604

Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence hybridization. *Proc Nat Acad Sci* 83: 2934-2938

Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J., Gray J. (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (23): 9138-9142

Popp S., Scholl H.P., Loos P., Jauch A., Stelzer E., Cremer C., Cremer T. (1990). Distribution of chromosome 18 and X centric heterochromatin in the interphase nucleus of cultured human cells. *Exp Cell Res* 189 (1): 1-12

Rabl C. (1885). Ueber Zelltheilung. *Morphologisches Jahrbuch*. 10: 214-330

Rigby P. W., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-251

Rubtsov N., Senger G., Kuzcera H., Neumann A., Kelbova C., Junker K., Beensen V., Claussen U. (1996). Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification and reverse painting. *Hum Genet* 97: 705-709

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491

Saitoh Y., Lämmli U.K. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76(4):609-622

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis A. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York

Schardin M., Cremer T., Hager H.D., Lang M. (1985). Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum Genet* 71 (4): 281-287

Schleiden M.J. (1838). Beiträge zur Phytogenesis.

Schrock E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. (1996). Spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497

Schwann, T. (1839). Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen.

Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 30: 971-972

Senger G., Chudoba I., Friedrich U., Tommerup N., Claussen U., Brondum-Nielsen K. (1997). Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenatal Diagnosis* 17: 369-374

Solovei I., Walter J., Cremer M., Habermann F., Schermelleh L., Cremer T. (2002b). FISH on three-dimensionally preserved nuclei. In: FISH, A Practical Approach, Ed: Beatty B., Mai S, Squire J. Pub: *Oxford University Press*, pp 119-157

Speicher M.R., Gwyn Ballard S., Ward D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12 (4): 368-375

Sperling K., Ludtke E. K. (1981). Arrangement of prematurely condensed chromosomes in cultured cells and lymphocytes of the Indian muntjac. *Chromosoma* 83 (4): 541-553

Stack S. M., Brown D.B., Dewey W.C. (1977). Visualization of interphase chromosomes. *J Cell Sci* 26: 281-299

Starke H., Raida M., Trifonov V., Clement J.H., Loncarevic I.F., Heller A., Bleck C., Nietzel A., Rubtsov N., Claussen U., Liehr T. (2001b). Molecular cytogenetic characterization of an acquired supernumerary minute marker chromosome as sole abnormality in a case clinically diagnosed as Philadelphia negative chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 113: 435-438

Starke H., Nietzel A., Weise A., Heller A., Mrasek K., Belitz B., Kelbova C., Volleth M., Albrecht B., Mitulla B., Trappe R., Bartels I., Adolph S., Dufke A., Singer S., Stumm M., Wegner R.D., Seidel J., Schmidt A., Kuechler A., Schreyer I., Claussen U., von Eggeling F., Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 114(1):51-67.

Starke H. (2004). Dissertation: Zentromernähe, chromosomale Rearrangements im menschlichen Genom. Institut für Humangenetik und Anthropologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Steinhaeuser U., Starke H., Nietzel A., Lindenau J., Ullmann P., Claussen U., Liehr T. (2002). Suspension S-FISH a new technique for interphase. *J Histochem Cytochem* 50: 1697-1698

Sumner A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304-306

Sutton W.S. (1904). The chromosomes inheritance. *Biol Bul.* 4: 231-248

Tijio J.H., Levan A. (1956). The chromosomal number of man. *Hereditas* 42: 1-6

Verma R.S., Babu A. (1994). Human chromosomes: Principles and techniques. *2nd ed. of McGraw-Hill, Inc.*

Volm T. (1992). Dissertation: Gibt es eine größenabhängige Verteilung von Chromosomen in menschlichen Fruchtwasserzellkernen? Institut für Humangenetik und Anthropologie, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

Vourc'h C., Taruscio D., Boyle A.L., Ward D.C. (1993). Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes. *Exp Cell Res* 205 (1): 142-151

Waldeyer W. (1888). Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosk Anat* 32: 1-22

Walter J., Joffe B., Bolzer A., Albiez H., Benedetti P. A., Müller S., Speicher M. R., Cremer T., Cremer M., Solovei I. (2006). Towards many colors in FISH on 3D-preserved interphase nuclei. *Cytogenet Genome Res* 114:367–378

Warburton D., Naylor A. F., Warburton F. E. (1973). Spatial relations of human chromosomes identified by quinacrine fluorescence at metaphase. I. Mean interchromosomal distances and distances from the cell center. *Humangenetik* 18 (4): 297-306

Weisblum B., De Haseth P. L. (1972). Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylaterich regions in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 629-632

Weise A., Starke H., Heller A., Tonnies H., Volleth M., Stumm M., Gabriele S., Nietzel A., Claussen U., Liehr T. (2002). Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterised by high resolution multicolour banding and region specific FISH probes. *J Med Genet* 39: 434-439

Weise A., Liehr T., Claussen U., Halbhuber K.J. (2005). Increased efficiency of fluorescence in situ hybridization (FISH) using the microwave. *J Histochem Cytochem* 53(10):1301-1303.

Wilson E.B. (1896). The Cell in Development and Inheritance

Wollenberg C., Kiefaber M.P., Zang K.D. (1982). Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. IX. Arrangement of chromosomes with and without spindle apparatus. *Hum Genet* 62 (4): 310-315

Zorn C., Cremer T., Cremer C., Zimmer J. (1976). Laser UV microirradiation of interphase nuclei and post-treatment with caffeine. A new approach to establish the arrangement of interphase chromosomes. *Hum Genet* 35(1):83-89

Zorn C., Cremer C., Cremer T., Zimmer J. (1979). Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp Cell Res* 124 (1): 111-119

VII. Publikationsliste

Publikationen

Steinhaeuser U., Starke H., Nietzel A., Lindenau J., Ullmann P., Claussen U., Liehr T. (2002). Suspension S-FISH – a new technique for interphase. *J Histochem Cytochem* 50:1697-1698

Liehr T., Starke H., Heller A., Kosyakova N., Mrasek K., Gross M., Karst C., **Steinhaeuser U.**, Hunstig F., Fickelscher I., Kuechler A., Trifonov V., Romanenko S.A., Weise A. (2006). Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied for FISH-banding. *Cytogenet Genome Res* 114, pp 240-244

Kongressbeiträge

Steinhaeuser U., Starke H., Nietzel A., Lindenau J., Ullmann P., Claussen U., Liehr T. (2002). Suspension fluorescence in situ hybridization (S-FISH) – a versatile technique for interphase analyses. *Med Genetik* 14, p 334 (Abstractnr. P2-1902)

Steinhaeuser U., Starke H., Trifonov V., Seidel J., Beensen V., Heller A., Claussen U., Liehr T. (2003). Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. *Med Genetik* 15, p 302 (Abstractnr. P-036)

Steinhaeuser U., Starke H., Claussen U., Liehr T. (2004). Suspension fluorescence in situ hybridization (S-FISH) – a handy technique for interphase analyses. *Med Genetik* 16, p 107 (Abstractnr. P06-011)

Steinhaeuser U., Starke H., Claussen U., Liehr T. (2004). Multicolor chromosome banding (MCB) in the interphase nucleus. *Europ J Hum Genet* 12 Suppl. 1, p 126 (Abstractnr. P0203)

Steinhaeuser U., Starke H., Ziegler M., Claussen U., Liehr T. (2005). Multicolorbanding applied in 3D-preserved interphase and metaphase nuclei. *Med Genetik* 17, pp 91-92 (Abstractnr. P144)

Hunstig F., Pellestor F., **Steinhaeuser U.**, Starke H., Ziegler M., Claussen U., Liehr T. (2006). Multicolor banding studies on the 'Barr-body' in 3D-preserved human lymphocytes and on chromosomal orientation in human sperm interphase nuclei. *Med Genetik* 18, p 83 (Abstractnr. P161)

Hunstig F., Pellestor F., **Steinhaeuser U.**, Starke H., Ziegler M., Claussen U., Liehr T. (2006). Multicolor banding studies on the 'Barr-body' in 3D-preserved human lymphocytes and on chromosomal orientation in human sperm interphase nuclei. *Abstractbook of the 2nd conference on X-inactivation*, p72.

VIII. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Dr. rer. nat./ med. habil Thomas Liehr

Frau Dr. rer. nat. Heike Starke

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar, noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und,

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 19.09.06

IX. Lebenslauf

Name: Steinhäuser, Ulf

Geburtsdatum: 18.09.1979

Geburtsort: Pößneck

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1986 –1990 Polytechnische Oberschule „Erich Weinert“, Pößneck

1991 –1998 Gymnasium „Am Weißen Turm“

1998 Abitur

Berufsausbildung

1998/99 Zivildienst beim DRK Rettungsdienst Pößneck mit Abschluß als
Rettungssanitäter

Studium:

09/1999 – jetzt Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität
Jena

04/2003 Ärztliche Vorprüfung

04/2004 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 10/2001 Promotionsarbeit am Institut für Humangenetik und
Anthropologie der FSU Jena bei Herrn Prof. Dr. U. Claussen

Jena, den 19.09.06

X. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zytogenetik“ unter Leitung von Herrn PD Dr. rer. nat med. habil. Thomas Liehr durchgeführt.

Aus diesem Grund möchte ich zunächst besonderen Dank an Dr. Thomas Liehr richten für seine hervorragende Betreuung, seine Ideen zur Lösung kleinerer und größerer Probleme und für seine unermüdliche Suche nach Finanzierungsmöglichkeiten, welche die Basis für den Erwerb von Technik und die Möglichkeit einer Studienpause darstellten.

Für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie durchführen zu können, sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft möchte ich dem Leiter des Instituts, Herrn Prof. Dr. med. Uwe Claussen, danken.

Für die freundliche Aufnahme und ihre Hilfsbereitschaft möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Zytogenetik“ danken. Einige sind mir dabei zu Freunden geworden und sollen hier gesondert erwähnt werden. Vielen Dank an Monika Ziegler, Kristin Mrasek, Anja Weise, Heike Nelle und Alma Küchler. Erwähnen möchte ich auch Frau Frederike Hunstig, welche die Entwicklungen dieser Arbeit in einer nachfolgenden Promotion anwendet und mir einige Bilder zur Verfügung stellte.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik und Anthropologie für die Hilfe bei der Lösung einiger Probleme, besonders Frau Susanne Michel, Frau Bettina Schimmel und Frau Heike Thieme.

Für die Vergabe eines einjährigen Stipendiums (QLRT-1999-31590) und der damit verbundenen Möglichkeit das Studium zu unterbrechen, möchte ich mich beim Förderverein der Friedrich-Schiller-Universität e.V. und der Carl Zeiss AG bedanken.

Ein spezieller Dank geht an meinen guten Freund Christian Gast - er weiß wofür.

Ein besonderer Dank an Familie Starke für viele aufmunternde und motivierende Worte und Ratschläge.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder für ihren immer währenden Stolz und Glauben in mich, die nie wieder gut zumachende finanzielle Unterstützung, die Motivation und das Verständnis während manchen Tiefs während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Zuletzt möchte ich mich bei Heike Starke für den immerwährenden liebe- und verständnisvollen Rückhalt, ihre Zuversicht und Unterstützung und nicht zuletzt für das größte Geschenk bedanken, was man einem Menschen machen kann – meinen Sohn Moritz.